Die Aufnahme von Strontium durch Zea Mays L. in Mischkultur mit Bodenpilzen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Peter Frei
aus Basel

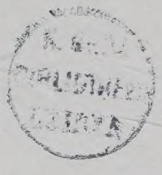
1962

Büchler + Co AG Wabern-Bern - 1963

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren Dr. *M. Geiger-Huber*
Dr. *H. Zoller*

Basel, den 26. Juni 1962

Prof. Dr. *C. Grob*
Prodekan



Separatabdruck aus «Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft»
1963, Band 73
(Als Sonderdruck erschienen am 16. Mai 1963)

Die Aufnahme von Strontium durch Zea Mays L. in Mischkultur mit Bodenpilzen

Von *Peter Frei*

Botanisches Institut der Universität Basel

Manuskript eingegangen am 20. November 1962

Inhalt

Einleitung 21
Methode 22
Versuchspflanzen 22
Nährlösung 23
Ausführung der Versuche 25
Aufarbeitung des Versuchsmaterials 27
Experimente 30
Einfluss verschiedener Pilze auf das Wachstum und die Strontiumaufnahme von Mais 31
Beeinflussung der Konkurrenz um das Strontium 35
Einfluss der Vorkultur 37
Einfluss der Dauer der Mischkultur 39
Einfluss der Glukosekonzentration 41
Ursachen der Konkurrenz 43
Einfluss des entfernt von der Wurzel wachsenden Pilzes 45
Einfluss der Antibiotika 47
Diskussion 51
Zusammenfassung 54
Zitierte Literatur 56

Einleitung

Jede Pflanze ist an ihrem natürlichen Standort den verschiedensten Einflüssen ausgesetzt. Neben den atmosphärischen Einwirkungen spielen die Bodenfaktoren eine bedeutende Rolle. Die chemische Zusammensetzung und die Struktur des Bodens, insbesondere aber auch die Mikroorganismen und die höheren Nachbarpflanzen, beeinflussen sie. Diese Organismen konkurrieren beispielsweise um die im Boden vorhandenen Nährstoffe. Sie wirken auch als Erzeuger von Ausscheidungsprodukten fördernder oder hemmender Natur; sie können derartige Produkte auch zerstören. Durch ihre Fähigkeit, Salze zu lösen, beeinflussen sie den Mineralstoffgehalt des Bodens; sie mineralisieren organische Stoffe usw.

Ihre Wirkung auf die Nachbarorganismen kann demzufolge positiv oder negativ sein.

Mit dem Studium der Beziehungen zwischen den Pflanzen, insbesondere auch zwischen den Mikroorganismen und den höheren Pflanzen, befassten sich seit der Jahrhundertwende zahlreiche Forscher. Die Betrachtungen über die Rhizosphäre und die Mykorrhiza stehen hier im Vordergrund, so in den Arbeiten von Frank (1885, 1888), Stahl (1900) und Starkey (1929a, 1929b, 1929c, 1931a, 1931b, 1938). Neueren Datums sind die Veröffentlichungen von Clark (1949) über die Rhizosphäre und Harley (1959), der das Problem der Mykorrhiza eingehend behandelt. Woods (1960) befasst sich mit den Wurzelausscheidungen, die sowohl für die höheren Nachbarpflanzen wie für die Mikroorganismen wichtig sind.

So ausgedehnt die Untersuchungen über die Zusammensetzung der Rhizosphäre und über die Mykorrhiza sind, so wenig weiss man über die Stoffaufnahme der Organismen unter diesen speziellen Bedingungen. Das dürfte vor allem dem Umstand zuzuschreiben sein, dass Versuche hierüber heikel sind und ihre Interpretation schwierig. Es war meine Aufgabe, im Rahmen von Arbeiten über die *Strontium*-Aufnahme durch die *höhere Pflanze* (Läuchli, 1962) und durch *Pilze* (Fankhauser, 1963) die speziellen Verhältnisse für die Aufnahme durch die *höhere Pflanze in Mischkultur mit Mikroorganismen* zu studieren.

Als Grundlage für die Methode diente die Arbeit von Vöchting (1953). Unter aseptischen Bedingungen wurde Mais allein und in Mischkultur mit einem Pilz gezogen und die Aufnahme von Strontium bestimmt. Der Vergleich der Mischkultur mit der Einzelkultur gibt Aufschluss über die Wirkung des Pilzes.

Methode

Versuchspflanzen

Die Aufnahme von Strontium wurde an *Zea Mays* L. studiert. Es gelangte ungarischer Saatmais zur Verwendung. Mais eignet sich infolge seines raschen und bei guter Auslese gleichmässigen Wachstums ausgezeichnet für die vorgesehenen Versuche. Er lässt sich auch leicht verarbeiten und eignet sich vorzüglich für die aseptische Kultur (Vöchting, 1953).

Grössere Schwierigkeiten bereitet die Wahl der Pilze, deren Einfluss auf die Strontiumaufnahme untersucht werden soll. Für die Untersuchung der Aufnahme ist es unerlässlich, dass der Mais nicht schon nach wenigen Tagen der Mischkultur abstirbt. Es ist bekannt, dass Pilze in Reinkulturen unter Umständen stark pathogen wirken können. Ihre Stoff-

wechselprodukte können hinsichtlich Qualität und Quantität von denen verschieden sein, die man unter natürlichen Bedingungen antrifft. Da, wie später noch beschrieben wird, der Pilz direkt um die Wurzel wächst, treten im Wurzelraum in dieser Hinsicht ganz besondere Verhältnisse auf. Der Mais muss sich aber während 7–10 Tagen der Mischkultur mit dem Pilz entwickeln und darf beim Abbruch des Versuchs keine Schäden zeigen. Gleichzeitig soll aber auch der Pilz genügend wachsen; er soll von der Wurzel abgetrennt und analysiert werden können.

In einem Vorversuch wurde eine grössere Anzahl Pilze auf ihre Eignung untersucht. Es wurden folgende Arten ausgewählt (Herkunft: Centralbureau für Pilzkulturen, Baarn):

Aspergillus ustus (Bain.) Thom et Church, Stamm Abbott;

Penicillium citrinum Thom, Stamm 806;

Penicillium patulum Bainier, Stamm CCU III.

Durch *Aspergillus ustus* wird Mais während der Versuchsdauer nicht geschädigt. Das pH der Kulturlösung weicht nicht von dem der Kontrolle ab. Von Vorteil ist, dass dieser Pilz in der Mischkultur nicht viele Sporen bildet, was für die Verarbeitung angenehm ist.

Penicillium citrinum und *Penicillium patulum* sind starke Bildner von Antibiotika; besonders *Penicillium patulum* wirkt stark pathogen und bringt den Mais relativ schnell zum Absterben. Das Myzel dieser Pilze ist nicht so gut entwickelt wie dasjenige von *Aspergillus ustus*. Im Verlauf des Versuchs kommt es jedoch bereits zur Sporenbildung. Das pH der Kulturlösung verändert sich unter den nachstehend beschriebenen Versuchsbedingungen nicht wesentlich.

Nährlösung

Um die Aufnahme eines Stoffes untersuchen zu können, muss man von einer genau definierten Nährlösung ausgehen. Die Verwendung von Erde und Leitungswasser scheidet für derartige Untersuchungen aus, denn ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften sind nicht zu überblicken. Auch Sandkulturen, die mit einer Nährlösung versehen werden, eignen sich nicht; es ist zu bedenken, dass das Wurzelsystem und der Pilz vollständig herausgeholt werden müssen, was bei einer Sandkultur Schwierigkeiten bereitet. Es ist auch zu befürchten, dass innerhalb der Kultur Konzentrationsunterschiede entstehen, die die Verhältnisse weiter komplizieren.

Bei der Herstellung der Nährlösung für die vorgesehenen Mischkulturen muss man auf die unterschiedlichen Bedürfnisse der *beiden* Partner Rücksicht nehmen. Während für Mais eine reine Ionenlösung genügt,

braucht der Pilz als heterotropher Organismus noch eine Kohlenstoffquelle. Durch geeignete Dosierung der Ionen und des Zuckers zum Beispiel hat man es in der Hand, den einen oder andern Partner zu fördern oder zu hemmen. Es hat sich gezeigt, dass eine für Mais günstige Nährlösung bei geeignetem Zuckerzusatz ohne weiteres auch für den Pilz verwendet werden kann. Vöchting (1953) empfiehlt für Mais eine verdünnte Knopsche Nährlösung. Die unverdünnte Lösung ruft, wie auch eigene Versuche gezeigt haben, Entwicklungsstörungen hervor. Noch günstiger schien mir eine etwas modifizierte Pfeffer-Robbins-Nährlösung (Robbins, 1922; siehe auch Burlet, 1940; Seiler, 1951). Diese Nährlösung wurde auch mit gutem Erfolg von Läuchli (1962) bei seinen Untersuchungen über die Strontiumaufnahme von Mais verwendet.

Spurenelemente: Die Nährlösung erhält einen Zusatz von 1 ml Hoaglandscher A-Z-Lösung[1] pro Liter und eine höhere Eisenkonzentration, weil die von Robbins (1922) angegebene in unserem Mais eine Chlorose erzeugte. In meinen Versuchen gab ich pro Liter Nährlösung 10 mg $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$. In den Vorversuchen trat nun trotzdem eine *Streifenchlorose* auf, die auf *Zink*mangel zurückgeführt werden kann (Reed und Beck, 1939). Durch Zugabe von zusätzlich 1 ml einer Zinksulfatlösung pro Liter (1,0 g $ZnSO_4$ in 18 l destilliertem Wasser) verschwand die Chlorose.

Wasserstoffionenkonzentration: Spezielle Aufmerksamkeit muss dem pH der Nährlösung geschenkt werden; denn diese Grösse ist für die Stoffaufnahme von grosser Bedeutung. Nach Vöchting (1953) stösst die Verwendung von Puffern auf Schwierigkeiten; den besonders geeigneten Phosphatpuffer verträgt Mais schlecht. Sie hielt deshalb die Glukosekonzentration möglichst niedrig, um den Pilz nicht zu übermässiger Säureproduktion anzuregen. Selbstverständlich muss auch bei der Wahl der Pilze darauf gesehen werden, dass sie nicht schon von Natur aus reichlich Säure bilden. Versuche haben ergeben, dass *Aspergillus ustus* keine Veränderung des pH der Mischkultur gegenüber der Kontrolle hervorruft. *Penicillium citrinum* und *Penicillium patulum* erzeugen bei geeigneter Glukosekonzentration eine schwach saure Kulturlösung, während jene mit Mais allein gegen pH 7 ansteigt.

Glukose: Da Pilze sowohl in Einzelkultur wie in Mischkultur eine Kohlenstoffquelle benötigen, wurde den Nährlösungen *Glukose* zugesetzt. Die Konzentration an Glukose bestimmte sehr stark die Konkurrenzkraft der beiden Partner; niedere Konzentrationen binden den Pilz im Wachstum

---

[1] Modifizierte Hoaglandsche A-Z-Lösung: $Al_2(SO_4)_3$ 1 g, KJ 0,5 g, KBr 0,5 g, TiO_2 1,0 g, $SnCl_2 \cdot 2\,H_2O$ 0,5 g, LiCl 0,5 g, $MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$ 7,0 g, H_3BO_3 11,0 g, $ZnSO_4$ 1,0 g, $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ 1,0 g, $NiSO_4 \cdot 6\,H_2O$ 1,0 g, H_2MoO_4 0,5 g, $Co(NO_3)_2 \cdot 6\,H_2O$ 1,0 g, destilliertes Wasser 18 l.

zurück, höhere schaden dem Mais. Zudem wirkt sich die Grösse der Glukosegabe auch auf das pH der Nährlösung aus. Als geeignet für die Mischkultur mit Mais wurden folgende Konzentrationen an Glukose gefunden: für *Aspergillus ustus* 2%, *Penicillium citrinum* 0,5% und *Penicillium patulum* 0,2%. Bei *Penicillium patulum* starb Mais trotz dieser geringen Glukosegabe innert einer Woche ab.

Strontiumzusatz: Das Strontium wurde als Chlorid ($SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$) zugegeben, das sehr hygroskopisch ist. Es wurde deshalb zuerst eine etwa 5prozentige Stammlösung hergestellt, deren Gehalt sich bequem *refraktometrisch* bestimmen liess (Wagner, 1928); daraus wurden dann die erforderlichen Verdünnungen hergestellt. Falls die Konzentration an Strontium nicht absichtlich variiert wurde, enthielt die Nährlösung jeweils 5 γ Sr/ml. In dieser Konzentration wirkte Strontium nicht giftig und war auch gut quantitativ bestimmbar.

Die Grundnährlösung hat folgende Zusammensetzung: $Ca(NO_3)_2$ 2,0g, KH_2PO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,5 g, KNO_3 0,5 g, KCl 0,25 g, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ 0,06 g, A-Z-Lösung 6 ml, $ZnSO_4$-Lösung 6 ml, Glukose variierend (siehe oben), entsalztes Wasser 6 l.

Reinheitsgrad der Chemikalien: Es wurden Substanzen der Qualität «zur Analyse» und «purissimum» verwendet. Eine besondere Reinigung auf *Strontium* war nicht nötig, da dieses Element nicht in nachweisbaren Mengen als Verunreinigung vorkam.

Das *Wasser* wurde durch Ionenaustausch (Gemischtbettverfahren) entsalzt. Es hatte einen spezifischen Widerstand von rund 2 Millionen Ohm.

Ausführung der Versuche

So wie es hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung der Nährlösung nötig ist, dass unter definierten Bedingungen gearbeitet wird, ist es auch unerlässlich, im Kulturgefäss in bezug auf die darin wachsenden Organismen eindeutige und klare Verhältnisse zu schaffen. Die Kulturen dürfen nur die Organismen enthalten, die im Versuch vorgesehen sind; denn alle Fremdorganismen, die sich in der glukosehaltigen Nährlösung ja leicht entwickeln können, greifen durch ihren Stoffwechsel in unkontrollierbarer Weise in die zu untersuchenden Beziehungen zwischen Mais und Pilz ein. Voraussetzung meiner Untersuchungen war daher *aseptische* Arbeitsweise.

Die Nährlösung wurde in Fernbach-Kolben abgefüllt (150 ml pro Kolben) und eine halbe Stunde bei 1 atü im Autoklav sterilisiert. Es entstand ein schwacher Niederschlag, der sich teilweise schon beim Schütteln des Kolbens oder in den ersten Tagen der Kultur auflöste.

Neben der aseptischen Arbeitsweise war es nötig, sich um die *Belüftung* der Kulturen zu kümmern (siehe auch Harley, 1959). Wie Vöchting (1953) ausführte, wird die Sauerstoffversorgung in Standkulturen infolge der Umwachsung der Wurzeln durch den Pilz schlecht. Sie schlägt vor, Schüttelkulturen zu verwenden. Dabei wird erstens die Nährlösung immer mit frischer Luft versorgt, und zweitens wird verhindert, dass der Pilz die Wurzel umwächst, was die Verarbeitung erleichtert. Trotzdem entschloss ich mich, mit Standkulturen zu arbeiten. Es wurden nur 150 ml Nährlösung verwendet, was im Fernbach-Kolben eine Schichtdicke von weniger als 2 cm ergab, so dass sich die Wurzeln nahe der Flüssigkeitsoberfläche entwickeln konnten. Gegen die Verwendung der Schüttelkultur sprach ferner die Tatsache, dass schon bei geringen Unterschieden der Schwingungsgeschwindigkeit wie auch der Art des Schwingens (zum Beispiel ruckartige Bewegung, Stossen, mehr kreisende Bewegung) grosse Unterschiede in der Myzelentwicklung auftreten können (Fankhauser, 1963, vergleiche auch Vöchting, 1953, Figur 7; Schaub, 1958). Dieser Missstand lässt sich auch nicht durch häufiges Umstellen der Kulturkolben völlig beseitigen.

Aufzucht der Pilze: Die verwendeten Pilze wurden in Röhrchen auf Bierwürzeagar gezogen und zur Gewinnung von genügend Sporen 3 bis 5 Wochen bei 25 °C in Kolle-Schalen wachsen gelassen. Mit einer 0,1 %-Tween-80-Lösung wurden die Sporen durch rasches Schütteln aus den Kolle-Schalen geschwemmt und die Kulturkolben mit etwa 1 Million Sporen beimpft. *Aspergillus ustus*, der auf Bierwürzeagar schwer Sporen bildete, wurde zu diesem Zweck auf Tomatenagar gezogen. *Penicillium citrinum* und *Penicillium patulum* erzeugten hingegen auf Bierwürzeagar reichlich Sporen und konnten schon nach 3 Wochen verwendet werden.

Aufzucht des Maises: Angesichts der komplizierten Arbeitsgänge und der zu erwartenden Unregelmässigkeit des Wachstums (vergleiche Vöchting, 1953) war es nötig, von Anfang an möglichst *gleichmässig wachsende* Pflanzen zu bekommen. Burlet (1940) empfiehlt die Verwendung *ganzer* Maiskolben, aus denen für den Versuch die geeigneten mittleren Körner ausgelesen werden; eine gute Auswahl erhält man auch, wenn man unbeschädigte Körner sorgfältig nach *Grösse* und *Form* ausliest.

Die sterile Aufzucht geschah nach Burlet (1940) und Rudin (1956). Zuerst wird mit einer spitzen Flamme der Fruchtstiel vorsichtig abgebrannt, da er der Hauptsitz der Infektionen ist. Die Körner werden sodann 5 Minuten in Wasser benetzt, dann 5 Minuten mit Seifenwasser kräftig gewaschen und schliesslich eine Viertelstunde im fliessenden Wasser gespült. Nach kurzem Eintauchen in heisses Wasser werden sie während 2 Stunden mit Bromwasser 1:500 (Bürgin-Wolff, 1959) im Quellapparat (Burlet, 1940) desinfiziert. Durch mehrmaliges Spülen mit steri-

lem Wasser wird das Brom entfernt. Nach 24stündigem Quellen (längeres Quellen erhöht die Gefahr einer Infektion) in durchlüftetem, sterilem Leitungswasser im Quellapparat werden die Körner aseptisch auf Keimröhrchen gesetzt. Nach 4 Tagen im Wärmeschrank bei 28 °C sind die Keimlinge so weit gewachsen, dass sie auf die Fernbach-Kolben gesetzt werden können; es werden dabei möglichst gleich grosse Pflanzen ausgelesen.

Vorkultur: Die Erfahrung hat gezeigt, dass der Mischkultur eine Vorkultur des Maises vorgeschaltet werden muss. Oft leiden nämlich die jungen Keimpflanzen durch die vielen bei der aseptischen Behandlung nötigen Handgriffe; so kommt es vor, dass die ersten Blätter etwas beschädigt werden und sich erst in der Vorkultur erholen. Die Vorkultur bietet auch eine weitere Möglichkeit der Auswahl. Sie ist ferner nötig, weil ihre Dauer die Konkurrenzverhältnisse in der Mischkultur mitbestimmt. Eine kürzere Vorkulturdauer bewirkt, dass der Mais vom Pilz bald überwuchert wird und eventuell rasch eingeht, eine längere hingegen stört den Pilz in seiner Entwicklung. Unter meinen Versuchsbedingungen erwies sich eine Vorkulturdauer von 7 Tagen als günstig. Für die Vorkultur wird eine modifizierte Pfeffer-Robbins-Nährlösung verwendet (siehe Seite 25), die weder Glukose noch Strontium enthält. Die klimatischen Verhältnisse sind die gleichen wie bei der Mischkultur.

Mischkultur: Nach der Vorkultur des Maises wird ein Nährlösungswechsel vorgenommen und die alte Kulturlösung durch eine frische, mit dem Pilz beimpfte Nährlösung aseptisch ersetzt, die die entsprechenden Zusätze an Strontium und Glukose enthält; für die Kontrollkultur bleibt die neue Lösung unbeimpft.

Die Dauer der Mischkultur betrug üblicherweise 7 Tage. Unter meinen Bedingungen waren dann noch beide Partner lebend und entwicklungsfähig, und es hatte noch keiner ein ausgesprochenes Übergewicht erreicht (siehe auch Seite 39ff.). Die Pflanzen wurden in klimatisierten Gewächshäusern gehalten; die Temperatur betrug rund 20 °C, wobei sie bei starker Besonnung und in Frostnächten etwas von diesem Wert abwich. Die Luftfeuchtigkeit betrug ungefähr 80%. Mit hinsichtlich Stärke und Zusammensetzung des Lichtes geeigneten, gleichmässig strahlenden Fluoreszenzlampen wurde eine 14stündige Beleuchtung pro Tag gesichert.

Aufarbeitung des Versuchsmaterials

Abbruch der Versuche: Die Versuche wurden meist nach 7 Tagen Mischkultur abgebrochen, die Maispflanzen in Spross und Wurzel getrennt und der Kornrest entfernt. Trotz aller Sorgfalt gelang es nicht, den stark an der Wurzel haftenden Pilz vollständig von ihr zu trennen. Die an der Wurzel haftende Kulturlösung wurde mit entsalztem Wasser in den Kulturkolben

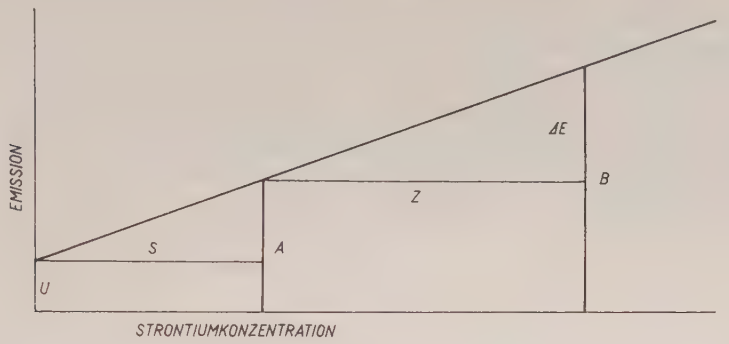
zurückgespült; ebenso wurde das beim Abnutschen des Pilzes auf aschefreiem Filter anfallende Waschwasser mit der Kulturflüssigkeit vereinigt. Dies geschah, um Wurzel und Pilz von anhaftenden, aber nicht aufgenommenen Strontiumionen möglichst zu befreien und den entstehenden Strontiumverlust in der Kulturlösung auszugleichen. Die Länge von Spross (Karyopse–Spitze des längsten Blattes) und Wurzel (Karyopse bis Spitze der längsten Wurzel) wurde gemessen; ebenso das Trockengewicht von Spross, Wurzel und Pilz bestimmt (Trocknung bei 105 °C).

Veraschung: Sie geschah nach Pedretti (1958) in der von ihm beschriebenen Apparatur. Diese besteht aus Pyrexglas, der Reaktionskolben aus Quarz. Quarz hat neben der chemischen Reinheit auch den Vorteil, dass er die ausserordentliche Beanspruchung durch das Erhitzen am besten erträgt. Die Oxydation des Pflanzenmaterials erfolgte durch zweimal destillierte *Salpetersäure*. Es wurde so lange neue Salpetersäure zugegeben, bis die Lösung rein weiss erschien; alsdann wurde mit *Wasserstoffperoxyd* fertig oxydiert. Durch zweimalige Behandlung mit Salzsäure wurden die Nitrate in Chloride übergeführt, und schliesslich wurde zur Trockne eingedampft. Nach der Bestimmung des Aschengewichtes musste die Asche aus dem Kolben gelöst werden. Sie enthält neben Chloriden auch noch Sulfate, Silikate und Phosphate und haftet sehr stark an den Kolbenwänden. Um sie von dort loszulösen und gleichzeitig unlösliche Bestandteile aufzuschliessen, wurde der Kolben mit viel Ammoniumkarbonat und wenig Wasser ausgescheuert. Diese Masse wurde anschliessend in Salzsäure gelöst. Durch Wiederholung dieser Behandlung gelang es, eine klare Lösung zu erhalten (Läuchli, 1962).

Bestimmung des Strontiums: Die vielgeübte Methode der radioaktiven Bestimmung konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Da andere Methoden sich als zuwenig empfindlich erwiesen, wurde das Strontium *flammenspektrophotometrisch* bestimmt. Für die Bestimmung stand ein Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, mit Photomultiplier zur Verfügung. Die Emission des Strontiums in der Wasserstoff-Sauerstoff-Flamme wurde bei einer Wellenlänge von 460,7 mμ gemessen unter Berücksichtigung des Untergrundes bei 458 und 462 mμ.

Eine solche Bestimmung des Strontiums aus *natürlichem* Material bereitet allerlei Schwierigkeiten, die in der unbestimmten und von Pflanze zu Pflanze variierenden chemischen Zusammensetzung des Pflanzenmaterials begründet liegen. Eine Bestimmung mit Hilfe von Eichkurven bietet deshalb unüberwindbare Schwierigkeiten, weil es nicht möglich ist, eine künstliche Aschenlösung mit den richtigen Salzverhältnissen zu konstruieren, was nötig wäre, um die verschiedenen Einflüsse der Fremdionen zu eliminieren. Eine hinreichend quantitative Abtrennung des Strontiums scheiterte ebenfalls. Der Aschenlösung wurde schliesslich eine

bestimmte Menge Strontium zugesetzt und dieser Zusatz als Massstab für den Strontiumgehalt der zusatzfreien Lösung verwendet. Voraussetzung ist allerdings, dass im betrachteten Konzentrationsbereich die Emission proportional der Strontiumkonzentration ist, was tatsächlich zutrifft.



Figur 1

Flammenspektrophotometrische Bestimmung des Strontiums (schematisch)

A Emission der Analysenlösung
B Emission der Analysenlösung mit Zusatz Z
ΔE Emission des Strontiumzusatzes Z
U Flammenuntergrund, gemessen bei 458 und 462 mμ
S Strontiumgehalt der Analysenlösung

Die Emission des Strontiums wurde bei 460,7 mμ gemessen

Figur 1 zeigt schematisch die Abhängigkeit der Emission von der Strontiumkonzentration. Wenn A die Emission der Analysenlösung ist, B die um ΔE vergrösserte Emission infolge des Strontiumzusatzes Z, dann lässt sich der Zusatz als Massstab für den Strontiumgehalt der Analysenlösung verwenden. Von A ist der Flammenuntergrund U abzuziehen.

Es gilt dann:

$$(A—U) : \Delta E = S : Z,$$

wobei S die Strontiumkonzentration der Analysenlösung ist.

Für S ergibt sich also:

$$S = \frac{(A—U) \cdot Z}{\Delta E}$$

Diese Methode hat den Vorteil, dass sowohl Analysenlösung wie Standard (= Zusatz Z) die gleichen störenden Ionen enthalten und deshalb ohne weiteres miteinander verglichen werden können.

Statistische Bewertung: Die Resultate wurden mit dem t-Test (Fisher, 1946, Seite 122) gesichert; Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p<0{,}01$ wurden als signifikant angesehen. Die Streuungen der Mittelwerte der Resultate lagen zwischen 5 und 10 % (bis 15 %). Eine sorgfältige Abschätzung der Streuung erfolgte unter Berücksichtigung des Fehlers der Strontiumbestimmung und der Streuung der Werte für Veraschung und Trockengewicht. Zur Sicherung dieser Abschätzung wurden auch Einzelveraschungen und -bestimmungen durchgeführt. Es musste darauf verzichtet werden, jede Kultur einzeln zu verarbeiten, einmal wegen zu geringer Mengen an Strontium und zu grosser Verluste beim Veraschen und dann wegen des erforderlichen übergrossen Zeitaufwandes (vergleiche Läuchli, 1962).

Experimente

Stahl (1900) schildert in seiner Arbeit über die Bedeutung der Mykorrhiza die *Konkurrenz* um die Nährstoffe. Durch die Mykorrhiza wird es gewissen Pflanzen möglich, gegenüber den andern Bodenorganismen konkurrenzfähiger zu sein. Während über die Mykorrhiza relativ viel bekannt ist, weiss man über die Konkurrenz der Wurzelsysteme und der Bodenorganismen um die Nährstoffe nur wenig. Auch die Verhältnisse in der Rhizosphäre sind kompliziert und demzufolge, wenigstens was die Stoffaufnahme der Pflanzen betrifft, wenig erforscht. Gerretsen (1948) hat den Einfluss von *Bakterien* auf die *Phosphat*-Aufnahme der höheren Pflanzen untersucht, wobei er das Phosphat in unlöslicher Form verabfolgte. Vöchting (1953) setzte sich mit dem Einfluss von *Aspergillus niger* auf die *Zink*-Aufnahme durch *Mais* auseinander. Besser studiert als die gegenseitige Beeinflussung der höheren Pflanzen und Bodenorganismen ist die der höheren Pflanzen untereinander.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Strontium wird zu den Ballaststoffen gezählt, die im Gegensatz zu den Nährstoffen nicht lebenswichtig sind, aber doch von den Pflanzen aufgenommen werden. Das Strontium bietet demnach den Vorteil, dass durch eine Konkurrenz um dieses Ion nicht schon Mangelzustände auftreten, die für eine veränderte Stoffaufnahme verantwortlich gemacht werden können, und damit die Verhältnisse kompliziert werden. Eine Beeinflussung kann bei Versuchen mit Strontium zum Beispiel eindeutiger auf Ausscheidungsprodukte oder auf die Konkurrenz um andere Stoffe zurückgeführt werden. Dann ist es vergleichsweise auch interessant, zu erfahren, ob dieser Ballaststoff anders aufgenommen wird als zum Beispiel das Spurenelement Zink.

Schon in den ersten Vorversuchen wurde deutlich, dass der Pilz zuerst die Wurzel umwächst und sich erst später als Decke auf der Oberfläche der

Nährlösung ausbreitet. Es ist zunächst unklar, warum sich der Pilz so verhält, findet er doch in der Nährlösung alles, was er zu seiner Entwicklung braucht. Diese Erscheinung legt die Vermutung nahe, dass der Pilz sich entweder der Wurzel als Träger bedient oder dass vom Mais Stoffe ausgeschieden werden, die das Pilzwachstum begünstigen. Um hierüber Klarheit zu gewinnen, verglich ich die Umwachsung einer Maiswurzel mit dem Verhalten des Pilzes, dem andere Träger zur Verfügung gestellt wurden. Wenn die Wurzel durch gereinigte und sterilisierte Holzwolle ersetzt wurde, umwuchs der Pilz diese Holzwolle. Fand aber eine gedrehte Nylonschnur oder gar Glaswolle Verwendung, dann trat keine Umwachsung auf; der Pilz wuchs frei in der Nährlösung. Nur an Stellen, wo die Schnur die Flüssigkeitsoberfläche erreichte oder durchstiess, haftete der Pilz etwas an der Schnur. Diese Befunde sprechen zugunsten einer Wirkung wachstumfördernder Ausscheidungsprodukte.

Einfluss verschiedener Pilze auf das Wachstum und die Strontiumaufnahme von Mais

Nach einer Vorkultur wird der Mais 7 Tage in Mischkultur mit *Aspergillus ustus*, *Penicillium citrinum*, beziehungsweise *Penicillium patulum* gehalten. Die Pilzfäden beginnen sehr bald die Wurzeln als Schlauch zu umwachsen. Später breiten sie sich auch auf der Oberfläche der Kulturlösung aus. Am üppigsten gedeiht *Aspergillus ustus*, der ein dichtes und von der Wurzel auf der Flüssigkeitsoberfläche sich ausbreitendes Myzel bildet. Nicht so stark entwickeln sich die beiden *Penicillium*-Arten; sie scheinen eher unabhängiger von der Wurzel zu sein und bilden leichter eine Decke.

Tabelle 1

Zea Mays: Hemmung des Längenwachstums (in %) durch Pilze
Vorkultur: 7 Tage, Mischkultur: 7 Tage

Pilze	*Aspergillus ustus*	*Penicillium citrinum*	*Penicillium patulum*
Spross	5,1	8,2	14,0
Wurzel	20,2	17,6	20,5

Das Wachstum von Mais hängt wesentlich vom Partner in der Mischkultur ab. In allen Fällen wirkt der Pilz schnell auf das Wurzelwachstum, das nach einer Woche der Mischkultur etwa 20 % hinter der Kontrolle zurückbleibt (Tabelle 1). Diese Hemmung ist nicht von der Strontiumkonzentration abhängig. Im Längenwachstum wird der Spross weniger

stark gehemmt als die Wurzel. Das Trockengewicht bleibt beim Spross jedoch deutlich hinter der Kontrolle zurück: die Hemmung beträgt 15% bei *Aspergillus ustus* als Partner, 12,5% bei *Penicillium citrinum* und 27,2% bei *Penicillium patulum*. *Penicillium patulum* bringt Mais auch innerhalb einer Woche zum Welken und sogar zum Absterben.

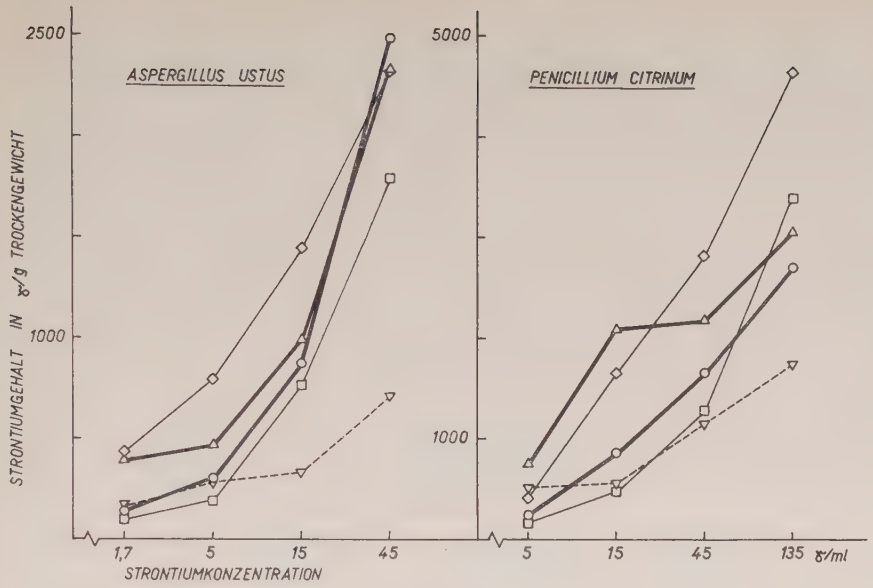
Aufschlussreich ist auch die Betrachtung des Aschengehaltes von Mais. Während derjenige des Sprosses häufig nicht so stark beeinflusst wird, erfährt der Aschengehalt der Wurzel in Mischkultur eine klare Abnahme (Tabelle 2). Der Aschengehalt des Sprosses wird, abgesehen bei der Einwirkung von *Penicillium patulum*, nicht so stark reduziert. Wie schon früher erwähnt, wirkt dieser Pilz ausgesprochen pathogen. Nach 4 bis 5 Tagen zeigen sich an der Wurzel bereits kleine braune Stellen; spätestens nach 7 Tagen welken die Pflanzen, die Blätter werden schlaff und gelblich, und die Pflanze stirbt ab. Dieser Prozess kann auf die *Patulin*-Bildung des Pilzes zurückgeführt werden. Nach Gäumann und Jaag (1947) treten bei *Tomatensprossen* bei *Patulin*-Behandlung ebensolche Erscheinungen auf.

Tabelle 2

Zea Mays: Beeinflussung des Aschengehaltes (in mg) der Wurzel durch den Pilzpartner
Vorkultur: 7 Tage, Mischkultur: 7 Tage
Nasse Veraschung nach Pedretti (1958), Mittelwerte aus 8 Kolben

Strontiumkonzentration in γ/ml	1,7	5	15	45	135
mit *Aspergillus ustus*	10,8	12,4	11,9	13,0	—
Kontrolle ohne Pilz	18,2	19,6	17,1	23,0	—
Hemmung in %	40,7	36,7	30,4	43,5	—
mit *Penicillium citrinum*	—	10,5	10,5	8,9	9,1
Kontrolle ohne Pilz	—	11,0	18,5	14,4	22,4
Hemmung in %	—	4,5	43,2	38,2	59,3
mit *Penicillium patulum*	—	10,1	10,9	10,4	11,1
Kontrolle ohne Pilz	—	18,5	14,3	19,9	19,2
Hemmung in %	—	45,3	23,8	47,7	42,2

Nachdem Mais in Mischkultur mit Pilzen im Wachstum gehemmt wird, ist zu erwarten, dass auch seine *Strontiumaufnahme* durch Pilze beeinflusst wird. In der Tat ist eine deutliche Herabsetzung der Aufnahme festzustellen, doch hängt diese auch von der Konzentration des Strontiums in der Nährlösung ab. In Figur 2 sind die auf das Trockengewicht bezogenen Werte des Strontiumgehaltes aufgetragen. Sowohl bei Mischkulturen mit



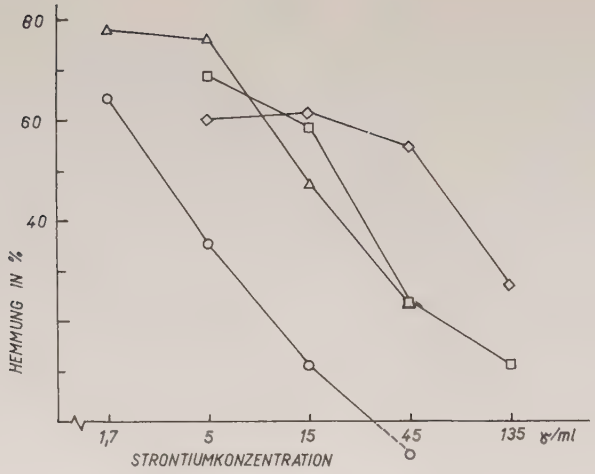
Figur 2

Zea Mays in Einzelkultur und in Mischkultur mit *Aspergillus ustus* (links) und mit *Penicillium citrinum* (rechts): Aufnahme des Strontiums bei verschiedenem Strontiumgehalt der Nährlösung

Vorkultur: 7 Tage. Mischkultur: 7 Tage

—○— Spross Mischkultur
—△— Spross Einzelkultur
—□— Wurzel Mischkultur
—◇— Wurzel Einzelkultur
---▽--- Pilz Mischkultur

Aspergillus ustus wie bei solchen mit *Penicillium citrinum* nimmt Mais bei niederen Strontiumkonzentrationen gegenüber der Kontrolle (Mais in Einzelkultur) viel weniger Strontium auf als bei höheren. Die beiden Kurven für die Strontiumaufnahme in Mischkultur und in Einzelkultur nähern sich mit steigender Strontiumkonzentration. Dieser Sachverhalt wird aus Figur 3 klarer, wo die Hemmung der Strontiumaufnahme bei Mais in der Mischkultur in Prozenten jener des Kontrollversuchs dargestellt ist. Bei niederem Strontiumgehalt der Nährlösung wird die Aufnahme wesentlich stärker gehemmt als bei höherem. In ihren Untersuchungen über die Phosphataufnahme durch Buchenwurzeln mit und ohne Mykorrhiza haben Harley und McCready (1952b) festgestellt, dass bei höheren Phosphatgaben die Aufnahme des Phosphats in die Wurzeln erhöht und relativ weniger in der Pilzschicht zurückgehalten wird; es tritt in der



Figur 3

Zea Mays in Mischkultur mit *Aspergillus ustus* beziehungsweise *Penicillium citrinum*
Hemmung der Strontiumaufnahme von Mais durch den Pilz

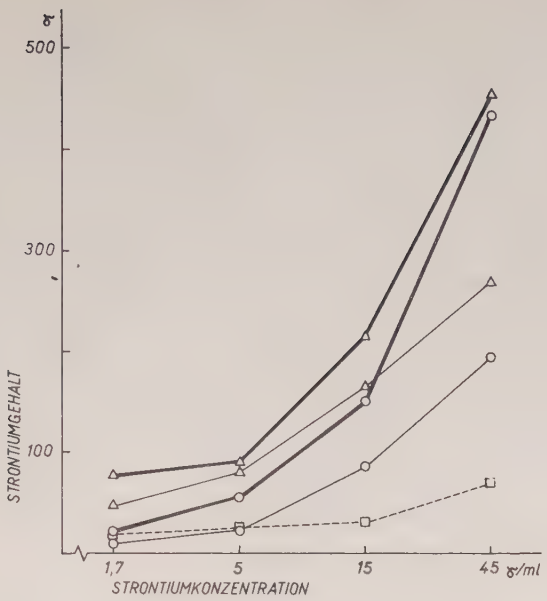
Vorkultur: 7 Tage. Mischkultur: 7 Tage

Mais in Mischkultur mit *Aspergillus ustus*	Spross	—○—
	Wurzel	—△—
Mais in Mischkultur mit *Penicillium citrinum*	Spross	—□—
	Wurzel	—◇—

Pilzschicht eine gewisse Sättigung auf, und das Phosphat kann vermehrt zwischen den Hyphen durchdringen. Der Pilz dient also nach der Meinung der Autoren gewissermassen als Regulator und Reservoir für Phosphat. Diese Eigenschaft der Mykorrhiza fand auch Morrison (1957), der die Phosphataufnahme durch *Pinus* untersuchte.

Den gleichen Verlauf der Aufnahmekurven wie in Figur 2 erhält man, wenn man die Totalaufnahme eines Pflanzenorgans (Spross oder Wurzel) beziehungsweise des Pilzes gegen die Strontiumkonzentration aufträgt. Bei dieser Darstellung (Figur 4) wird auf den Wachstumszustand der Pflanze keine Rücksicht genommen, und der Vergleich erfolgt für die gesamte aufgenommene Strontiummenge während der Mischkultur.

Abweichende Ergebnisse erhielt ich bei *Penicillium patulum* als Partner von Mais. Hier trat bei höheren Konzentrationen die obenerwähnte Annäherung der Kurven der Mischkultur und der Kontrolle nicht auf. Im Gegenteil ist aus Figur 5 zu erkennen, dass bei höheren Konzentrationen an Strontium in der Nährlösung dessen Aufnahme stark zurückbleibt, verglichen mit den Mischkulturen von Mais mit den beiden anderen



Figur 4

Zea Mays in Einzelkultur und in Mischkultur mit *Aspergillus ustus:* Mittlere Strontiumaufnahme bei verschiedenen Strontiumkonzentrationen der Nährlösung, berechnet auf ein Organ von Mais beziehungsweise ein Pilzmyzel

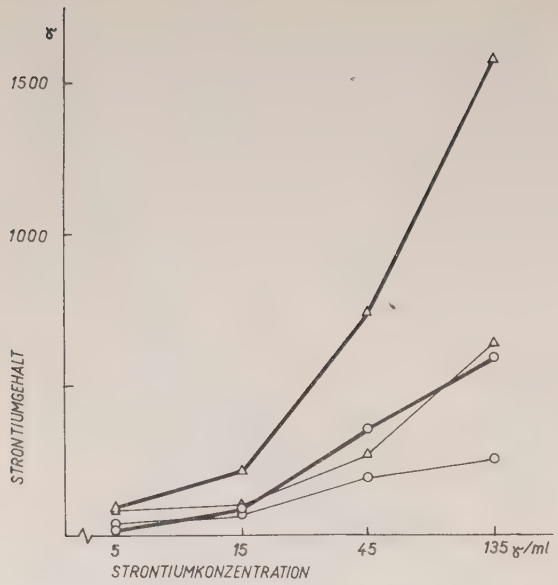
Vorkultur: 7 Tage. Mischkultur: 7 Tage

Mischkultur, Spross —○— Einzelkultur, Spross —△—
Mischkultur, Wurzel —○— Einzelkultur, Wurzel —△—
Mischkultur, Pilz ----□----

Pilzen (Figuren 2 und 4). Es ist anzunehmen, dass dieser abweichende Effekt auf das Absterben der Maispflanzen während des Versuchs zurückzuführen ist; durch die höhere Strontiumkonzentration gelangt zwar mehr Strontium an die Wurzel, weil der Pilz weniger davon abfängt; aber der Mais kann infolge seines vorzeitigen Absterbens nicht davon profitieren.

Beeinflussung der Konkurrenz um das Strontium

Um einen besseren Einblick in die Ursache zu bekommen, die die gegenseitige Beeinflussung der Strontiumaufnahme der benützten Versuchspflanzen bedingt, ist es nötig, die Konkurrenzbedingungen für die beiden Partner, Mais und Pilz, zu verändern. Dies ist zunächst einmal möglich, indem man, ohne von der Zusammensetzung der Nährlösung abzuweichen, die beteiligten Pflanzen in einem andern *Entwicklungszustand*



Figur 5

Zea Mays in Einzelkultur und in Mischkultur mit *Penicillium patulum:* Mittlere Strontiumaufnahme bei verschiedenen Strontiumkonzentrationen der Nährlösung, berechnet auf ein Organ bei Mais, beziehungsweise ein Pilzmyzel

Vorkultur: 7 Tage. Mischkultur: 7 Tage. Glukose: 0,2 %

Mischkultur, Spross —○— Einzelkultur, Spross —△—
Mischkultur, Wurzel —○— Einzelkultur, Wurzel —△—

für die Mischkultur verwendet. Je nachdem die Maiskultur früher oder später mit dem Pilz beimpft wird, erweist sich die Widerstandskraft der Maispflanze ihm gegenüber als mehr oder minder gross. Auch die *Dauer des Zusammenlebens* der beiden Organismen dürfte wohl das Konkurrenzvermögen ebenfalls beeinflussen; besonders dann wird dies zutreffen, wenn der Pilz pathogen wirkt, wie es bei *Penicillium patulum* der Fall ist. Der Pilz, als heterotropher Organismus, wird anderseits auf die *Kohlenstoffquelle* empfindlich sein. Je nach der Grösse der Glukosegabe wird er mehr oder weniger gefördert. Weitere denkbare Faktoren, wie Licht, Temperatur, Tageslänge, die hier eventuell einen Einfluss ausüben können, sind nicht untersucht worden.

Dass der Entwicklungszustand der Pflanze einen Einfluss auf die Konkurrenz haben kann, wurde schon von Starkey (1929b) nachgewiesen; er stellte eine qualitative und quantitative Änderung der Mikroflora der Rhizosphäre im Laufe der Entwicklung der Pflanze fest.

Einfluss der Vorkultur

Vöchting (1953) hat in ihrer Arbeit über die Zinkaufnahme von Mais in Gegenwart von *Aspergillus niger* festgestellt, dass die *Dauer* der Vorkultur bei *Mais* wesentlich für das Gelingen der Mischkultur ist. Je älter der Mais ist, desto schwieriger gestalten sich die Verhältnisse für den Pilz. Wird der Pilz in eine zu junge Maiskultur geimpft, dann nimmt er bald überhand und vernichtet unter Umständen sogar den Mais.

Gleiches konnte auch ich in meinen Kulturen beobachten. In einer Mischkultur von *Mais* und *Aspergillus ustus* bildete sich bei 2tägiger Vorkultur des Maises eine dicke Pilzdecke aus; bei 8tägiger Vorkultur wuchs der Pilz ebenfalls gut, aber vorwiegend den Wurzeln entlang. Neben 14 Tage vorkultiviertem Mais hatte der Pilz sichtlich Mühe aufzukommen; er umwuchs die Wurzel nur als dünnes, schlauchartiges Myzel, das lediglich stellenweise etwas dicker war. In diesem letzten Falle war es auch mühsam und selten möglich, den Pilz gänzlich von der Wurzel abzutrennen.

Tabelle 3

Zea Mays und *Aspergillus ustus* in Mischkultur

Einfluss der Dauer der Vorkultur des Maises auf die Entwicklung der beiden Partner

Der Pilz wurde am Ende der Vorkultur geimpft

Dauer der Mischkultur: 7 Tage, Dauer der Einzelkultur: 7 Tage, entsprechend der Mischkultur. Temperatur etwa 20 °C, Tageslänge: 14 Stunden. Es sind die Mittelwerte aus 8 Kulturen angegeben

Vorkultur des Maises	Trockengewicht von *Aspergillus ustus*			Trockengewicht von *Zea Mays*		
	Mischkultur		Einzelkultur	Mischkultur		Einzelkultur
2 Tage	153 mg	30 %[1]	220 mg	127 mg	35 %[2]	194 mg
8 Tage	53 mg	76 %[1]		257 mg	15 %[2]	304 mg
14 Tage	46 mg	79 %[1]		315 mg	4 %[2]	327 mg

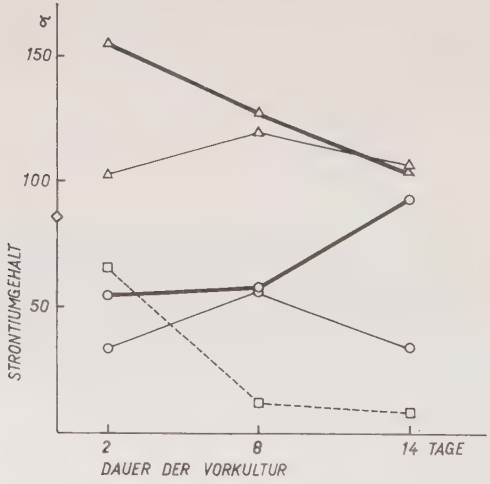
[1] Hemmung des Wachstums durch Mais.

[2] Hemmung des Wachstums durch den Pilz.

Aus Tabelle 3 ist zu ersehen, wie mit zunehmender Dauer der Vorkultur des Maises der Pilz infolge der besseren Ausbildung seines Partners sich weniger stark entwickelt, während der Zustand des Maises in Mischkultur sich der Kontrollkultur ohne Pilzkonkurrenz nähert. Es besteht also eine direkte Beziehung zwischen dem besseren Gedeihen des einen Partners und dem schlechteren des andern. Besonders deutlich wird das aus den

Kolonnen 3 und 6, wo die Hemmung des Wachstums durch Mais, beziehungsweise Pilz dargestellt ist. Diese wechselseitigen Beziehungen traten in allen Versuchen zutage. Immer gedeiht der Mais schlechter, wenn seine Wurzeln über und über verpilzt sind, und immer hat der Pilz Mühe, neben einem kräftigen Mais aufzukommen. Die Konkurrenzverhältnisse lassen sich also schon rein äusserlich erkennen; so treten zum Beispiel bei starker Pilz-Entwicklung *Chlorosen* und *Welkeerscheinungen* an Mais auf. Bei sorgfältig «ausbalancierten» Experimenten lassen sich solche Schäden auf ein Minimum beschränken, so dass bei Abbruch des Versuchs relativ gesunde Partner der Mischkultur mit der Kontrollpflanze ohne Partner verglichen werden können.

Parallel der Entwicklung von Mais und Pilz geht die Strontiumaufnahme. Infolge der unterschiedlichen Myzelentwicklung bei kurzer, beziehungsweise langer Vorkultur ist das Abtrennen des Pilzes von der Wurzel nicht so gleichmässig und sauber durchzuführen; auch die Bestimmung des Strontiumgehaltes der Wurzel ist dann weniger genau als beim Spross oder in anderen Versuchen mit gleichartigem Myzel. Deutlich ist jedenfalls, dass die Kurven für die Strontiumaufnahme (Figur 6) bei der Einzelkultur höher liegen als bei den Mischkulturen. Dass die Hemmung der Strontiumaufnahme bei der Wurzel nicht von der Dauer der Vorkultur



Figur 6

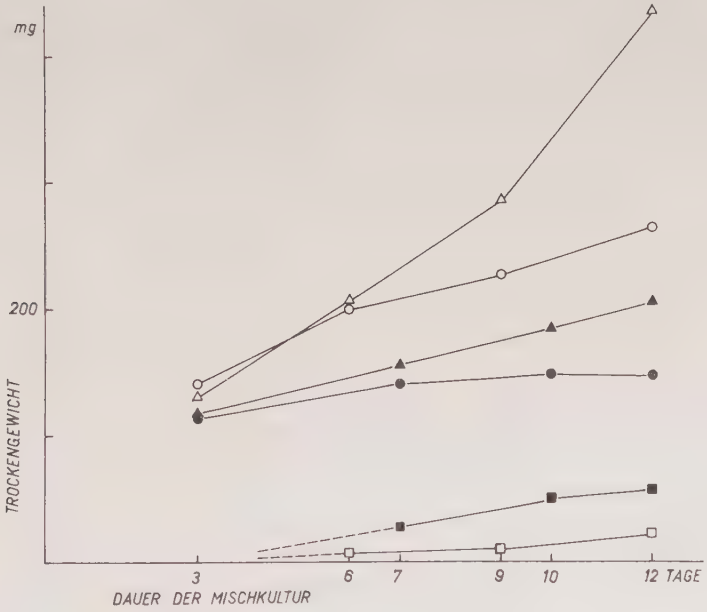
Zea Mays: Einfluss der Dauer der Vorkultur auf die Aufnahme des Strontiums während der Mischkultur (7 Tage) mit *Aspergillus ustus.* Glukosegehalt: 2 %. Temperatur etwa 20 °C

Mischkultur, Spross —○— Einzelkultur, Spross —△—
Mischkultur, Wurzel —○— Einzelkultur, Wurzel —△—
Mischkultur, Pilz ----□---- Einzelkultur, Pilz ◇

abzuhängen scheint, liegt vermutlich an der Tatsache, dass der Pilz in jedem Fall die Wurzel umwuchs und so in der Rhizosphäre gleichartige Bedingungen schuf. Der Pilz selbst nimmt bei längerer Vorkultur des Maises weniger Strontium auf als bei kurzer und auch weniger als in der Kontrolle ohne Mais.

Einfluss der Dauer der Mischkultur

Nicht nur der Entwicklungszustand des Maises im Moment des Beimpfens mit dem Pilz spielt für das Konkurrenzvermögen eine erhebliche Rolle, auch die Dauer des Zusammenlebens ist von Bedeutung. Es ist bekannt, dass sich im Boden die Zusammensetzung der Mikroflora der Rhizosphäre im Laufe der Zeit ändert (Starkey, 1929b). Es ist demnach zu erwarten, dass sich auch die Stoffaufnahme ändert. Das kann durchaus auch dann auftreten, wenn die Flora der Rhizosphäre, wie in unserem Fall,



Figur 7

Zea Mays und *Penicillium citrinum* in Mischkultur
Entwicklung des Maissprosses und des Pilzes

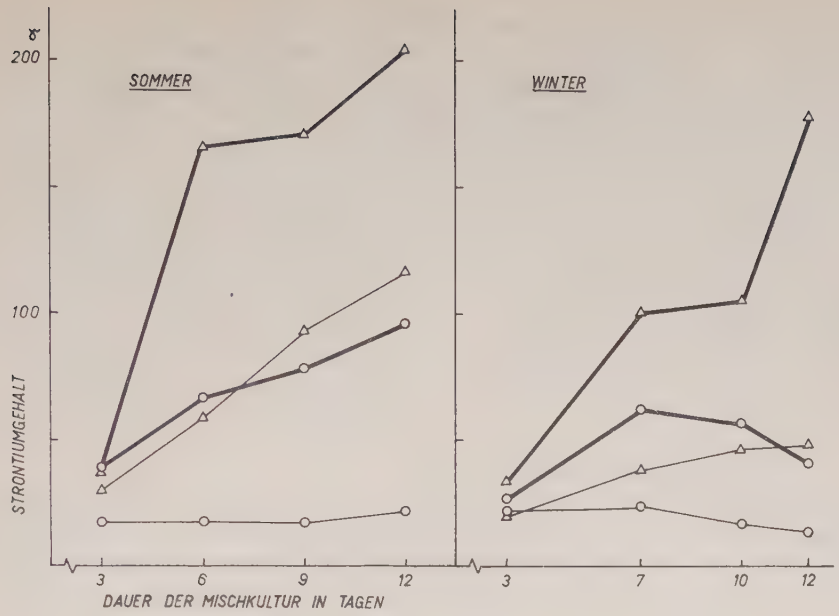
Sommer		Winter
—○—	Mischkultur	—●—
—△—	Einzelkultur	—▲—
—□—	Pilz	—■—

in ihrer systematischen Zusammensetzung nicht ändert. Solches hat Morrison (1957) an *Pinus*-Keimlingen untersucht. Er hat gefunden, dass die Phosphataufnahme zunächst bei mykorrhizafreien Pflanzen höher ist als bei solchen mit Mykorrhiza. Nach etwa 3 Wochen haben dann aber die Keimlinge mit Mykorrhiza begonnen, mehr Phosphat aufzunehmen als die andern ohne Mykorrhiza. Nach Morrison nimmt zuerst der Pilzmantel hauptsächlich Phosphat auf, und erst wenn dieser abgesättigt ist, gelangt vermehrt Phosphat in die Wurzel. Der Pilz stellt also eine Barriere dar, gleichzeitig aber auch ein Reservoir.

Da im allgemeinen Pilze, die normalerweise als harmlose Saprophyten im Boden leben, in Reinkultur leicht pathogen werden, ist zu erwarten, dass bei längerer Mischkultur der Pilz in meinen Versuchen überhandnimmt und den Mais zugrunde richtet.

Neben dem Alter der Organismen spielen aber auch in sehr starkem Masse andere, äussere Faktoren eine Rolle. Zwei Versuche mit *Mais* in Mischkultur mit *Penicillium citrinum* sollen das veranschaulichen. Der eine Versuch wurde im Sommer bei schönem Wetter ausgeführt, der andere im Winter. Im Sommer wuchs der Mais erheblich besser als im Winter, der Pilz hingegen schlechter. Umgekehrt gedieh der Pilz im Winter besser als im Sommer (Figur 7). Die Temperatur war im Winter ziemlich gleichmässig um 20 °C, die sonstigen Bedingungen, die besonders den Mais beeinflussen, waren im Winter aber schlechter.

Diese unterschiedlichen Bedingungen für die Entwicklung von Mais und Pilz wirken sich auch auf die Aufnahme des Strontiums aus. Dem besseren Wachstum von Mais im Sommer geht eine höhere Strontiumaufnahme parallel; insbesondere vermag sich der Mais auch in der Mischkultur besser zu halten als im Winter (Figur 8). Im Winter kann der Mais dem Pilz nicht länger als 12 Tage widerstehen; die Strontiumaufnahme geht nach einem anfänglichen Anstieg wieder zurück. Trotz der günstigeren Verhältnisse im Sommer stirbt der Mais doch nach längerer Mischkultur ab, wie es im Winterversuch schon nach 12 Tagen geschehen ist. Der zugegebene Pilz wird also nicht, wie ein Mykorrhizapilz, nach einer gewissen Zeit die höhere Pflanze bei der Stoffaufnahme unterstützen und als Regulator dienen (Morrison, 1957): er wirkt pathogen und überwuchert die Maiswurzel mit der Zeit vollständig. In diesem Zusammenhang seien Vorversuche erwähnt, in denen *Aspergillus niger* verwendet worden ist. Dieser Pilz wirkt sehr stark toxisch auf den Mais, der bereits nach wenigen Tagen zugrunde geht, worauf sogar der Spross ziemlich schnell von andern Pilzen befallen wird. Diese ausserordentlich toxische Wirkung ist auch Vöchting (1953) bekannt gewesen. Mit Hilfe der Schüttelkultur ist es ihr aber trotzdem gelungen, den Mais genügend lange in Mischkultur zu halten, was in Standkulturen nicht gelingt.



Figur 8

Zea Mays in Einzelkultur und in Mischkultur mit *Penicillium citrinum*
Einfluss der Mischkulturdauer auf die Strontiumaufnahme

Vorkultur: 7 Tage. Strontiumkonzentration: 5 γ/ml. Glukosekonzentration: 0,5 %

Mischkultur, Spross —○— Einzelkultur, Spross —△—
Mischkultur, Wurzel —○— Einzelkultur, Wurzel —△—

Einfluss der Glukosekonzentration

Die im Boden vorhandenen organischen Stoffe sind für das Gedeihen der Bodenmikroorganismen von lebenswichtiger Bedeutung, da die heterotrophen Organismen unter ihnen auf sie angewiesen sind. Der Reichtum an Organismen hängt unter anderem von der Menge der organischen Stoffe im Boden ab; Humusböden sind reicher an ihnen als Sandböden. Besondere Verhältnisse herrschen in dieser Beziehung in der Rhizosphäre, in der Ausscheidungsprodukte aller Art zu finden sind (Woods, 1960).

In analoger Weise lässt sich im Experiment durch die Variation des Glukosegehaltes das Konkurrenzvermögen des Pilzes gegenüber Mais beeinflussen; ausserdem ist auch eine direkte Wirkung auf Mais festzustellen.

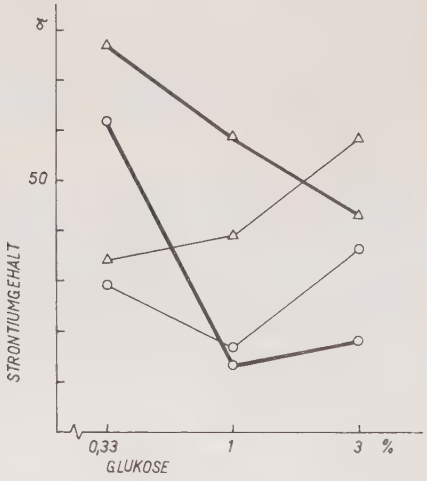
In Tabelle 4 ist der Glukosegehalt der Kulturlösung nach einer Woche Mischkultur mit *Aspergillus ustus* angegeben; sie zeigt, dass bei niederer

Tabelle 4

Zea Mays und *Aspergillus ustus* in Mischkultur
Glukosegehalt der Nährlösung und Pilzwachstum in 7 Tagen
Vorkultur bei Mais dauert 7 Tage
Bestimmung der Glukose nach Nelson (1944)

Anfangs-konzentration an Glukose	Glukosekonzentration nach 7 Tagen		Trockengewicht von
	Mischkultur	Einzelkultur (nur Mais)	*Aspergillus ustus* aus Mischkultur
0,33 %	0,102 %	0,274 %	112 mg
1,00 %	0,74 %	0,97 %	177 mg
3,00 %	2,64 %	2,96 %	219 mg

Konzentration ein erheblicher Teil der Glukose aufgebraucht wird. Verhältnismässig weniger Glukose wird bei höherer Konzentration aufgenommen. Vergleichsweise sieht man aus der letzten Kolonne, dass der Pilz sich bei mehr Glukose stärker entwickelt. Da nun der Pilz gerade um die Wurzel wächst, ist anzunehmen, dass in der Rhizosphäre der Zucker-



Figur 9

Zea Mays in Einzelkultur und in Mischkultur mit *Aspergillus ustus*
Einfluss der Glukosekonzentration auf die Strontiumaufnahme von *Zea Mays*
Vorkultur: 7 Tage. Mischkultur: 7 Tage. Strontiumkonzentration: 5 γ/ml

Mischkultur, Spross —○— Einzelkultur, Spross —△—
Mischkultur, Wurzel —○— Einzelkultur, Wurzel —△—

gehalt als Folge des stärkeren lokalen Zuckerverbrauchs geringer ist als in der freien Nährlösung.

Die Aufnahme des Strontiums hängt von verschiedenen Faktoren ab. Mit steigender Glukosekonzentration nimmt sie im Maisspross ab. Ebenfalls negativ wirkt sich der Pilz aus, weil er sich stärker entwickelt, wenn ihm mehr Zucker zur Verfügung steht; gleichzeitig wirkt er aber auch günstig, weil er die Glukosekonzentration um die Wurzel herum herabsetzt. Während die Aufnahme von Strontium in den Spross relativ stark beeinflusst wird, scheint die Zunahme an Glukose den Strontiumgehalt der Wurzel nur schwach zu verändern, und zwar leicht zu erhöhen (Figur 9). In allen Fällen wurde die Aufnahme des Strontiums durch Mais in Mischkultur gegenüber der Einzelkultur gehemmt und zwar um etwa 20% bis 80%, wie aus Figur 9 zu ersehen ist.

Es ist beizufügen, dass wir es hier allerdings mit recht komplexen Erscheinungen, die sich gegenseitig überlagern können, zu tun haben, da Mais wie auch der Pilzpartner durch verschiedene Glukosekonzentrationen verschieden beeinflusst werden, was sowohl das Wachstum als auch die Bildung von Stoffwechselprodukten, wie zum Beispiel *Säuren, Antibiotika*, anbelangt.

Ursachen der Konkurrenz

Aus den bisherigen Versuchen geht hervor, dass die Strontiumaufnahme von Mais durch alle untersuchten Pilze gehemmt wird, allerdings in unterschiedlichem Masse. Aber auch die Strontiumaufnahme der Pilze wird in Mischkultur mit Mais herabgesetzt, wobei der Entwicklungszustand des Maises (Dauer der Vorkultur) von Bedeutung ist (Tabelle 5). An einigen Beispielen ist sodann gezeigt worden, wie sich die Konkurrenz der beiden Partner beeinflussen lässt. Es ist damit aber noch nichts über die Ursachen der Hemmung ausgesagt. Wir wissen nicht, ob es sich um

Tabelle 5

Mischkultur von *Zea Mays* mit *Aspergillus ustus:* Aufnahme von Strontium durch den Pilz
Strontiumkonzentration: 5 γ/ml, Dauer der Mischkultur: 7 Tage

Dauer der Vorkultur von Mais	Strontiumaufnahme des Pilzes in γ/g Trockengewicht
2 Tage	426
8 Tage	219
14 Tage	172
Pilz in Einzelkultur	417

eine direkte Konkurrenz um das Strontiumion, um eine Erschwerung der Aufnahme durch den Pilzmantel oder um eine Beeinflussung des Mechanismus der Ionenaufnahme durch Ausscheidungsprodukte handelt. Schliesslich könnte es auch sein, dass durch die Hemmung der Aufnahme eines andern Ions die Strontiumaufnahme *indirekt* beeinflusst wird, ähnlich wie es Gerretsen (1948) für die Phosphataufnahme bei Eisenmangel beschrieben hat.

Eine *direkte* Konkurrenz um das Strontium findet sicher statt; denn sowohl Mais wie Pilz nehmen es auf. Die Konkurrenz wirkt sich aber nur bei geringen Konzentrationen an Strontium auf die Aufnahme aus; denn diese ist besonders beim Pilz bescheiden. Da das Strontium nicht zu den lebenswichtigen Elementen gehört, treten bei geringer Aufnahme an Strontium jedoch keine Mangelerscheinungen auf. Tabelle 6 zeigt die Strontiumaufnahme von *Aspergillus ustus*, *Penicillium citrinum* und *Penicillium patulum* in Mischkultur mit Mais; sie lässt deutlich erkennen, dass trotz der Aufnahme durch den Pilz noch reichlich Strontium in der Nährlösung bleibt, um dem Mais eine grössere Aufnahme zu erlauben. Die Aufnahme des Strontiums bei Mais in Einzelkultur ist etwa von der Grössenordnung der totalen Aufnahme der Mischkultur. Wenn also Mais Strontium doch nicht entsprechend der noch verfügbaren Konzentration aufnimmt, dann müssen andere Gründe vorliegen. Zunächst kann man sich denken, dass der Pilz, der ja als Mantel die Wurzel umhüllt, die verfügbare Strontiumkonzentration unmittelbar um die Wurzel so stark herabsetzt, dass der Mais nicht in den Genuss der in der freien Lösung vorhandenen Strontiumionen kommt. Hierzu ist allerdings zu bemerken,

Tabelle 6

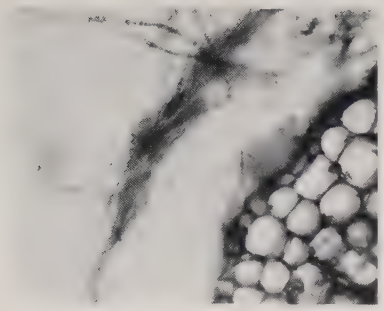
Zea Mays in Mischkultur mit verschiedenen Pilzen

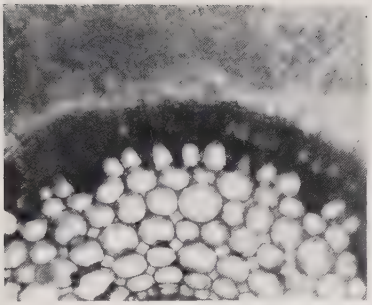
Strontiumaufnahme der Partner während 7 Tagen in Prozenten des dargebotenen Strontiums

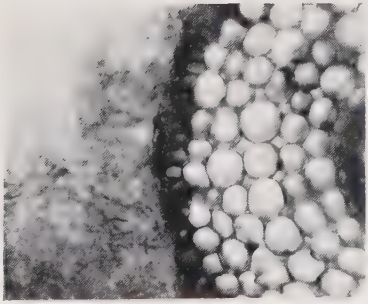
Temperatur etwa 20 °C. Tageslänge: 14 Stunden, Vorkultur: 7 Tage

Mittelwerte aus 8 Kulturen

Anfangskonzentration an Strontium	Strontiumaufnahme in %					
	Aspergillus ustus (21.–28.8.61)		*Penicillium citrinum* (23.2.–2.3.61)		*Penicillium patulum* (22.–29.3.61)	
	Pilz	Mais	Pilz	Mais	Pilz	Mais
1,7 γ/ml	7,4	12,3	—	—	—	—
5 γ/ml	3,4	10,4	2,8	8,1	10,5	8,1
15 γ/ml	1,4	10,6	1,1	9,5	8,6	6,9
45 γ/ml	1,0	9,4	0,7	5,4	6,1	8,0
135 γ/ml	—	—	0,4	3,9	3,3	4,1



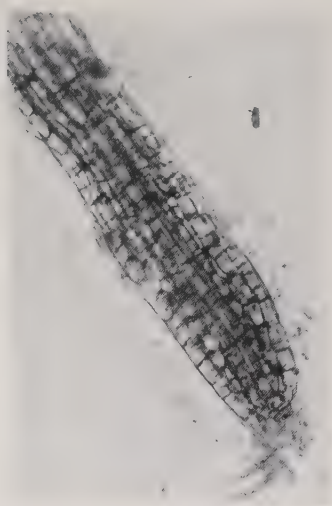




Figur 10

Zea Mays in Mischkultur mit *Aspergillus ustus*

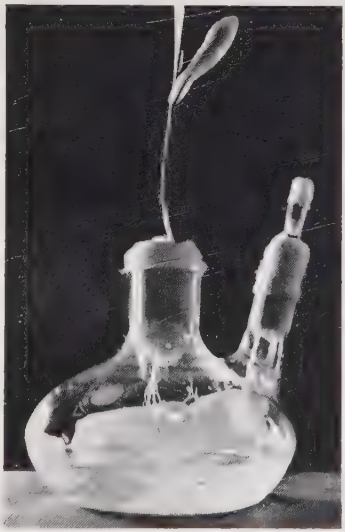
Verschieden starker Pilzbefall der Wurzel in einer 6tägigen Mischkultur



Figur 11

Zea Mays in Mischkultur mit *Penicillium patulum*

Junge Wurzel aus einer 4tägigen Mischkultur, vom Pilz locker umwachsen



Figur 12

Zea Mays in Mischkultur mit *Aspergillus ustus:* Der Pilz wird durch das Einführrohr rechts geimpft und entwickelt sich in einem Sack aus Dialysierschlauch, der ihn von der Wurzel fernhält

dass aus der freien Nährlösung ja automatisch, infolge des Konzentrationsgefälles, immer Ionen nachgeschoben werden. Nur in Fällen einer totalen und dichten Umhüllung, wie sie etwa bei einer ektotrophen Mykorrhiza auftritt, mag die Wurzel selbst an der direkten Stoffaufnahme gehindert werden. Wie die Verhältnisse bei der Umwachsung der *Mais*-Wurzel durch *Aspergillus ustus* sind, ist aus Figur 10 zu erkennen. An den dargestellten Querschnitten durch Wurzeln aus einer 6tägigen Mischkultur sind die verschiedenen Stadien des Pilzbefalls zu erkennen. Gewöhnlich tritt zuerst, und zwar vor allem an jungen Wurzelteilen, eine dünne, schlauchförmige Umhüllung der Wurzel auf (Figur 10 oben), etwa wie sie Jahn (1934) für seine *peritrophe Mykorrhiza* angibt. In fortgeschritteneren Stadien, beziehungsweise an älteren Wurzelteilen, tritt aber eine gewisse «parasitäre» Natur des Pilzes deutlich hervor; er beginnt in die Epidermis und auch in die Wurzelrinde einzudringen (Figur 10 Mitte und unten). Die Pilzhyphen stossen dabei zwischen den Zellen in den Interzellularräumen vor: eine Schädigung der Maispflanze wurde allerdings auch dann noch nicht festgestellt. Nach einigen gemachten Beobachtungen ist es aber nicht ausgeschlossen, dass in einem späteren Zeitpunkt der Pilz auch in die Zellen eindringt. Tatsächlich wird bei längerer Mischkultur der Mais schliesslich auch geschädigt.

Figur 11 zeigt eine junge *Mais*-Wurzel, die von *Penicillium patulum* locker und wolkig umhüllt ist. Bei älteren Kulturen ist auch hier der Pilzmantel dichter; ebenso machen sich dann die pathogenen Eigenschaften dieses Pilzes bemerkbar.

Die folgenden Versuche werden zeigen, dass die Konkurrenz nicht nur in einer Erniedrigung der Strontiumkonzentration liegen kann.

Einfluss des entfernt von der Wurzel wachsenden Pilzes

Es musste zuerst durch eine geeignete Methode dafür gesorgt werden, dass der Pilz nicht um die Wurzel wachsen konnte. Die von Vöchting (1953) verwendete Methode der Schüttelkultur reichte für diese Zwecke nicht aus, da der Pilz trotz Schütteln die Wurzeln teilweise umhüllte. Es wurde auch versucht, den Pilz vorzukultivieren und ihn als 2 Tage alte Myzelkügelchen zu impfen. Der Erfolg war aber auch in diesem Fall gering: die Kügelchen verfingen sich im Wurzelwerk und wuchsen von dort ziemlich schnell der Wurzel entlang aus. Der Pilz wurde deshalb in einem besonderen Sack aus Dialysierschlauch[1] kultiviert, der ihn am Vordringen

[1] Herr cand. phil. P. Müller schlug mir die Verwendung eines Sackes aus «eiweissdichtem» Dialysierschlauch vor, wofür ich ihm bestens danke.

an die Wurzel hinderte. Der Pilz befand sich in der gleichen Nährlösung wie Mais (Figur 12). Kontrollbestimmungen hatten ergeben, dass am Ende des Versuchs innerhalb und ausserhalb des Sackes die gleiche Strontiumkonzentration vorhanden war. Zur Mischkultur musste der Mais aus der Vorkultur umgesetzt werden; der Nährlösungswechsel konnte aus technischen Gründen nicht wie in den bisherigen Versuchen durch Umgiessen der Nährlösung erfolgen. Die Beimpfung der Kultur mit *Aspergillus ustus* geschah durch die seitliche Einführung in das Rohr, an dem der Sack hängt. Diese Versuchsanordnung hat zudem den Vorteil, dass die Mischkultur und die Kontrolle hinsichtlich der Belüftung der Wurzeln gleichgestellt sind und somit die Möglichkeit eines Einflusses infolge der schlechteren Luftversorgung auf die Stoffaufnahme wegfällt.

Tabelle 7

Zea Mays und *Aspergillus ustus* in 13tägiger Mischkultur

a) Mischkultur mit von der Wurzel getrennt wachsendem Pilz (Figur 12)

b) Mischkultur mit Pilz, der die Wurzel umwächst

	Strontiumgehalt in γ/g Trockengewicht	
	Spross	Wurzel
Mais in Einzelkultur	583	955
a) Mischkultur: Wurzel von Pilz getrennt	270	402
b) Mischkultur: Wurzel von Pilz umwachsen	169,5	278

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse eines solchen Versuches dargestellt. Die Strontiumaufnahme ist verglichen mit jener der Einzelkultur von Mais und jener der Mischkultur mit umwachsenen Wurzeln. Es ist ohne weiteres zu erkennen, dass trotz dem separaten Wachstum des Pilzes die Strontiumaufnahme bei Mais herabgesetzt ist. Die Werte liegen zwischen denen der reinen Einzelkultur und denen der Mischkultur. Der Versuch zeigt deutlich, dass auch bei Entfernung des Pilzes von der Wurzeloberfläche und bei gleichen Belüftungsbedingungen für die Wurzeln die Strontiumaufnahme vermindert ist. Es muss sich demnach um den Einfluss eines Stoffwechselproduktes des Pilzes handeln, das den Dialysierschlauch passieren kann. Schon Vöchting (1953) hat vermutet, dass die von ihr festgestellte Hemmung der *Zink*-Aufnahme bei Mais durch *Aspergillus niger* auf die Wirkung *antibiotischer* Stoffe zurückzuführen ist.

Verschiedene Forscher haben Versuche mit Kulturfiltraten von Pilzen gemacht und ihren Einfluss auf das Wachstum verschiedener Organismen und Organe untersucht; der Einfluss auf die Stoffaufnahme hingegen ist unbehandelt geblieben. In einer interessanten Arbeit hat Wallhäusser (1951a, 1951b) die gegenseitige Beeinflussung von Pilzen einer natürlichen Population beschrieben. Er hat dabei auch die Verhältnisse am natürlichen Standort durchleuchtet, doch erstreckt sich die Untersuchung nicht auf die Stoffaufnahme. Über den Einfluss von *Aspergillus niger* auf das Wachstum von höheren Pflanzen ist schon berichtet worden. So hat Seiler (1951) die Hemmung des Wurzelwachstums bei *Zea Mays* mit einer speziellen Apparatur gemessen, die gestattet, die Wurzellänge ständig und direkt mit dem Mikroskop genau festzustellen, wobei die Wurzel dauernd mit frischer Nährlösung und Luft versorgt wird. Er hat unter anderem klar festgestellt, dass die Kulturlösung von *Aspergillus niger* und gewisse Antibiotika eine wachstumshemmende Wirkung haben, andere, wie das *Penicillin*, sind weniger aktiv. *Patulin* und *Citrinin* sind je nach Konzentration stark hemmend. Nach Gäumann und Jaag (1947) bewirkt das *Patulin* ein Welken von Tomatenpflanzen. Wie eingangs erwähnt, zeichnen sich auch meine Mischkulturen von *Mais* mit *Penicillium patulum* dadurch aus, dass Mais schon nach kurzer Zeit zu welken anfängt.

Aus all diesen Tatsachen geht hervor, dass die Antibiotika Wachstum und Gedeihen der höheren Pflanzen stark beeinflussen. Es muss nun aber gezeigt werden, dass diese Stoffe auch tatsächlich einen wesentlichen Einfluss auf die Strontiumaufnahme ausüben.

Einfluss der Antibiotika

Nachdem aus dem Vorausgegangenen klargeworden sein dürfte, dass eine direkte Konkurrenz der Pilze durch Aufnahme des Strontiums als alleinige Ursache der verminderten Strontiumaufnahme von Mais nicht in Frage kommt, ist der Einfluss ihrer *Antibiotika* zu untersuchen, da schon die einleitenden Versuche mit *Penicillium patulum* und *Penicillium citrinum* (siehe Seite 31 ff.) sehr deutlich eine stark hemmende Wirkung zeigten. Es interessiert zunächst, in welchen Konzentrationen Patulin beziehungsweise Citrinin wirksam sind.

Die Kulturen wurden wie üblich ausgeführt. Es wurde eine Vorkultur von 7 Tagen eingehalten und anschliessend ein Nährlösungswechsel vorgenommen. Die nun mit Antibiotika versetzte Nährlösung für Mais, die der früheren Nährlösung für die Mischkultur entspricht, enthielt keine Glukose, aber 5 γ Strontium pro ml und 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} und 10^{-4}molar Citrinin beziehungsweise Patulin. Diese Stoffe wurden im hiesigen Institut aus den entsprechenden Pilzkulturlösungen gewonnen (Citrinin: SMP 165 °C statt 168 °C, Patulin: SMP 109 °C statt 111 °C). Um die Antibiotika zu schonen, wurde die Lösung mit Patulin nur zweimal im strömenden Dampf während ½ Stunde sterilisiert, die citrininhaltige Lösung aber normal ½ Stunde bei 1 atü im Autoklav. Da die Lösungen keine Glukose

enthielten, war die Gefahr der späteren Verseuchung durch Fremdorganismen nicht gross; die Kulturlösungen waren denn auch bei Versuchsabbruch völlig klar.

Das Längenwachstum der Wurzel war unter Berücksichtigung der relativ grossen Streuung kaum reduziert; lediglich die 10^{-4}molare Antibiotikalösung schien hemmend zu wirken. Demgegenüber wird der Spross stärker beeinflusst, doch sind auch hier nur die höheren Konzentrationen wirksam (Tabelle 8). Wenn man die Trockengewichte betrachtet (Tabelle 9), so ist zunächst ebenfalls keine Hemmung bei der Wurzel festzustellen, ja das Citrinin scheint sogar leicht fördernd zu wirken. Sehr deutlich wird das Trockengewicht des Sprosses besonders bei höheren Konzentrationen und bei Patulin stärker als bei Citrinin herabgesetzt.

Tabelle 8

Zea Mays: Einfluss von Citrinin und Patulin auf das Längenwachstum
Vorkultur: 7 Tage. Einwirkung des Antibiotikums: 7 Tage
Länge in cm, Durchschnitt aus 8 Pflanzen

Antibiotikum	Konzentration	0 m	10^{-7} m	10^{-6} m	10^{-5} m	10^{-4} m
Citrinin	Spross	43,3	42,0	41,1	36,1	38,9
	Wurzel	46,6	41,7	41,5	41,5	41,6
Patulin	Spross	43,3	40,5	40,9	39,9	31,0
	Wurzel	46,6	51,4	46,4	46,3	37,9

Auffällig ist eine starke Störung des Sprosswachstums und das Auftreten von Welkeerscheinungen. Dies deutet darauf hin, dass diese Antibiotika in den Spross aufgenommen werden und in erster Linie dort wirken. Das Patulin ist als starkes *Plasmagift* bekannt (Gäumann et al., 1947; Reusser, 1952), das sehr schnell in die Zellen eindringt und ihre Lebenstätigkeit beeinflusst. Nach Gäumann und Jaag (1947) ist das Patulin auch ein stark wirkender Welkestoff, der den Wasserhaushalt empfindlich beeinflusst. Die Anwendung einer 10^{-2}molaren Patulinlösung führte zum Zusammenbruch der Tomatensprosse, die in diese Lösung eingestellt waren. Bei 10^{-4} und 10^{-5}m wurde kein Welken mehr beobachtet. In meinen eigenen Versuchen welkten die Maispflanzen noch bei 10^{-4}m Patulin, während das Citrinin kein Welken hervorrief.

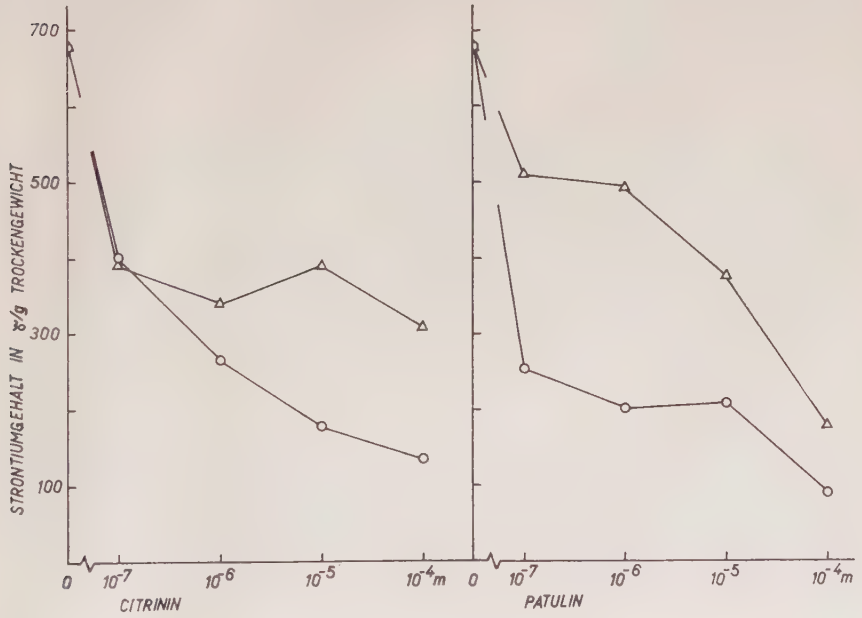
Dass solche Antibiotika, die derart tiefgreifend die Lebensvorgänge in der Pflanze beeinflussen, ebenfalls die Aufnahme von Ionen und auch jene des Strontiums verändern, ist anzunehmen. In einem weiten Konzentrationsbereich wurde denn auch besonders stark die Aufnahme des Stron-

Tabelle 9

Zea Mays: Einfluss von Citrinin und Patulin auf das Trockengewicht
Vorkultur: 7 Tage. Einwirkung des Antibiotikums: 7 Tage
Trockengewicht in mg, Durchschnitt aus 8 Pflanzen

Antibiotikum	Konzentration	0 m	10^{-7} m	10^{-6} m	10^{-5} m	10^{-4} m
Citrinin	Spross	160	162	159	152	137
	Wurzel	49	59	52	53	54
Patulin	Spross	160	145	149	128	116
	Wurzel	49	57	53	40	43

tiums in den Spross herabgesetzt, aber auch die Wurzel wies einen viel niedrigeren Strontiumgehalt auf als die Kontrolle ohne Antibiotikum (Figur 13). Beobachtungen machen es wahrscheinlich, dass die in Figur 13

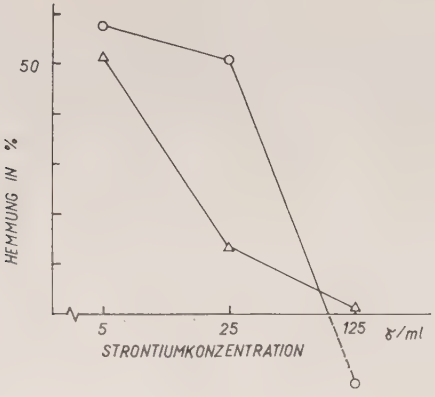


Figur 13

Zea Mays: Einfluss der Antibiotika Citrinin und Patulin auf die Strontiumaufnahme
Einwirkungsdauer der Antibiotika: 7 Tage. Strontiumkonzentration: 5 γ/ml
Spross —○— Wurzel —△—

angegebenen Anfangskonzentrationen durch die Sterilisation etwas herabgesetzt worden waren.

Interessant ist nun die Frage, wie sich die Hemmung durch die Antibiotika auswirkt, wenn das *Strontium* in *verschiedenen* Mengen gegeben wird. Aus den einleitenden Versuchen ist bekannt, dass mit steigender Konzentration an Strontium eine Art Sättigung erfolgt. Da die Antibiotika meist starke Plasmagifte sind, muss man im Versuch mit ihrer Konzentration so weit heruntergehen, dass an Mais keine ernsten Schädigungen beobachtet werden. Die Strontiumaufnahme wird bei niederen Konzentrationen an Strontium am stärksten gehemmt, bei höheren tritt keine Hemmung mehr auf. In Figur 14 sind die Hemmungskurven für



Figur 14

Zea Mays: Einfluss von Citrinin auf die Strontiumaufnahme bei verschiedenen Strontiumkonzentrationen

Einwirkungsdauer des Citrinins: 7 Tage. Citrininkonzentration: 10^{-5} molar

Spross —○— . Wurzel —△—

Spross und Wurzel aufgetragen. Ihr Verlauf gleicht auffallend dem der entsprechenden Versuche mit den Pilzen (vergleiche Figur 3). Tabelle 10 gibt die auf das Trockengewicht bezogenen Werte der Strontiumaufnahme wieder. Auch hier ist schön eine Annäherung der Werte der Kulturen mit und ohne Antibiotikum mit steigender Strontiumkonzentration zu beobachten.

Die eben beschriebenen Versuche zeigen, dass die Wirkung der Antibiotika für die Stoffaufnahme höherer Pflanzen von erheblicher Bedeutung ist. Indem sie die Pflanzen stark beeinflussen und selbst schädigen können, bewirken sie zwangsläufig auch eine Beeinträchtigung der Ionen-

Tabelle 10

Zea Mays: Einfluss des Citrinins auf die Strontiumaufnahme bei verschiedenen Strontiumkonzentrationen der Nährlösung

Vorkultur: 7 Tage. Einwirkung des Citrinins: 7 Tage. Citrininkonzentration: 10^{-5} m

Strontium-konzentration	Strontiumgehalt in γ/g Trockengewicht			
	Spross		Wurzel	
	mit Citrinin	ohne Citrinin	mit Citrinin	ohne Citrinin
5 γ/ml	690	1625	785	1626
25 γ/ml	1156	2350	2330	2700
125 γ/ml	4770	4200	8800	8910

aufnahme. Wie aber geringe Konzentrationen an Antibiotika auf das Wachstum fördernd wirken können, ist es denkbar, dass diese die Aufnahme von Ionen auch stimulieren könnten. Auch diese Möglichkeit muss beachtet werden, wenn man die hier experimentell gewonnenen Ergebnisse auf die Verhältnisse in der freien Natur übertragen will.

Diskussion

Es liegt in der Natur der Sache, dass sich Untersuchungen über die stofflichen Beziehungen zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen schwierig gestalten; dies gilt sowohl hinsichtlich der Methode als auch der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse. Um einen Einblick in die Ionenaufnahme bekommen zu können, muss man die Verhältnisse so vereinfachen, dass sie überblickbar werden. Man ist also gezwungen, ein in jeder Hinsicht kompliziertes System, wie es der Boden darstellt, durch ein solches zu ersetzen, das sowohl hinsichtlich der Ionen wie auch der Organismen genau bekannt ist. Man verwendet hierzu vorteilhaft Kulturen in Nährlösungen von genau definierter, chemischer Zusammensetzung. Es ist überdies unbedingt nötig, dass aseptisch gearbeitet wird; denn Fremdorganismen irgendwelcher Art können das zu untersuchende System in unkontrollierbarer Weise beeinflussen. Da die verwendeten Nährlösungen des Pilzes wegen ja Zucker enthalten müssen, ist die Gefahr unzulässiger Infektionen gross. Unvermeidlich sind hie und da auftretende «innere» Infektionen, die schon im Maiskorn vorhanden sind (siehe Bürgin-Wolff, 1959, Seite 78) und beispielsweise mit dem Hervorbrechen der Wurzel in die Nährlösung gelangen; solche Kulturen scheiden für die Betrachtung aus. Der Vergleich einer künstlichen Mischkultur aus Mais und Pilz mit einer reinen Einzelkultur von Mais gibt Aufschluss

über die Wirkung des Pilzes. Nur muss man sich davor hüten, solche Resultate unbesehen auf natürliche Verhältnisse, zum Beispiel im Boden, zu übertragen.

Zunächst ist an den Mischkulturen zu beobachten, dass alle untersuchten Pilze die Wurzeln ausnahmslos umwachsen. Die weitere Ausbreitung der Pilzhyphen geschieht in erster Linie von den Wurzeln nahe der Wasseroberfläche aus. Es ist gezeigt worden, dass die Wurzel nicht als Stützorgan für den Pilz dient, sondern dass der Pilz wahrscheinlich durch die *Ausscheidungsprodukte* der Wurzel in der Rhizosphäre günstigere Lebensbedingungen findet. Dies zeigt, dass selbst in Flüssigkeitskulturen so etwas wie eine Rhizosphäre existiert. Schon Stille (1938) gelang es, künstliche Rhizosphären mit verschiedenen Bakterien zu erzeugen. Frenzel (1960), der Aminosäuren und Amide als Ausscheidungsprodukte von *Helianthus annus* nachwies, liess Defektmutanten von *Neurospora crassa* in durchlüfteten Mischkulturen wachsen. Der Pilz umwuchs die Wurzeln von *Helianthus* als relativ lockerer Mantel. Die Verpilzung, die in meinen Versuchen auftrat, war zuerst locker, später aber dichter, und schliesslich drang der Pilz auch in die Wurzel ein (Figuren 10 und 11). Das Bild einer solchen Verpilzung gleicht dem einer *ektotrophen Mykorrhiza* (vergleiche Harley und McCready, 1952a). Es findet ebenfalls eine morphologische Durchdringung statt, doch wirkt in meinen Versuchen der Pilz nicht als Symbiont. Winter (1953) schreibt, dass das Wachstum verschiedener *Gramineen* mit verpilzten Wurzeln meist schlechter, niemals aber besser als unverpilzt sei. Schon Stahl (1900) beschreibt die Konkurrenz, die um die Nährstoffe im Boden stattfindet, am Beispiel von *Sinapis alba*, *Linum usitatissimum* und *Lepidium sativum* in sterilisiertem und nichtsterilisiertem Boden. Besonders in nährstoffarmem Milieu sei die Stoffaufnahme der höheren Pflanze durch die Konkurrenz der Mikroorganismen sehr erschwert; dagegen seien mit Mykorrhiza versehene Pflanzen gegenüber andern konkurrenzfähiger. Dass die Ionen durch das Pilzmyzel in den Wirt gelangen können, zeigten Melin und Nilsson (1955) und Melin et al. (1958) mit Hilfe von radioaktiven Ionen. Diese Ionen befanden sich in einem besondern Behälter in der Kultur und konnten nur durch Vermittlung des Pilzes, der den Behälter überwucherte, in die *Pinus*-Versuchspflanzen gelangen. Die Mykorrhiza dient aber nicht nur der Nahrungsvermittlung, sondern auch der Speicherung, wie Harley und McCready (1952a, 1952b) mit Phosphaten nachgewiesen haben. Rund 90% des aufgenommenen Phosphors sind im Pilz zu finden. Nach Morrison (1957) hat diese Speicherung zur Folge, dass Phosphor zuerst in der Mykorrhiza festgelegt wird und von dort aus langsam an die höhere Pflanze abgegeben wird. Die mykorrhizafreie Pflanze dagegen nimmt zuerst viel mehr Phosphat auf, doch fehlt ihr das Reservoir in Form des Pilzes.

Bei den *Gramineen* liegen die Verhältnisse etwas anders, da die Mykorrhiza nicht ektotroph, sondern endotroph ist und nur ein äusserst geringes Aussenmyzel besitzt, das mit wenigen Hyphen mit dem innern Myzel verbunden ist (Winter, 1953). Als nahrungsaufnehmendes Organ kann dieses schwache Gebilde kaum dienen. Darüber hinaus leben in der Rhizosphäre der Gramineen noch andere Pilze. Tolle und Rippel-Baldes (1958) isolierten eine grössere Anzahl Rhizosphärenpilze. Sie konnten aber feststellen, dass diese nicht spezifisch für die Gramineen sind, sondern auch auf Wurzeln anderer Pflanzen vorkommen. Auch in meinen Vorversuchen wuchsen alle geprüften Pilze gut auf Maiswurzeln, in keinem Fall hielt sich ein Pilz von der Wurzel fern.

Was nun die Stoffaufnahme anbetrifft, so wäre die im Experiment auftretende Umwachsung durchaus in der Lage, dem Mais Nährstoffe von aussen zu vermitteln; denn morphologisch ist eine enge Verbindung mit der Wurzel da (siehe Figur 10). Die untersuchten Pilze üben aber eine antibiotische Wirkung aus; diese ist es nun, die die Stoffaufnahme beeinträchtigt. Schon Vöchting (1953, Seite 150ff.) hat ja vermutet, dass in ihren Versuchen die Zinkaufnahme von Mais durch antibiotische Stoffe reduziert wird. Dass diese Annahme durchaus berechtigt ist, wird durch den hemmenden Einfluss der Antibiotika auf die Entwicklung der höheren Pflanze bewiesen. Selbst bei der schwächsten Konzentration, die ich in meinen Versuchen anwandte, war noch eine deutliche Hemmung der Strontiumaufnahme zu konstatieren.

Damit nun die Antibiotika im Boden zur Wirkung kommen können, müssen sie zumindest eine gewisse *Stabilität* haben und auch in genügender *Konzentration* frei vorkommen. Die Hemmung, die im Versuch festgestellt wird, braucht im Boden nicht unbedingt auch aufzutreten. Es kann sein, dass solche Stoffe in viel zu geringer Menge gebildet werden und damit vielleicht sogar einen fördernden Effekt haben können oder dass sie schnell zerstört oder inaktiviert werden. In der Tat hat man festgestellt, dass die Antibiotika im Boden mehr oder weniger rasch abgebaut werden, anderseits aber auch, dass sie dauernd neu gebildet werden, was die Voraussetzung für eine Anhäufung in der Rhizosphäre schafft (Winter, 1950; Winter und Willeke, 1951a). Ferner kennt man Antibiotika von erstaunlicher Stabilität; während zum Beispiel das Penicillin relativ rasch zerstört wird, ist das Streptomycin ziemlich beständig, wie Winter (1952) festgestellt hat. Jefferys (1952) hat eine Reihe von Antibiotika auf ihre Stabilität in verschiedenen Böden untersucht und unter anderem gefunden, dass das *Patulin*, das in meinen Versuchen speziell interessiert, sehr stabil ist. In den verschiedenen Böden ist eine unterschiedliche Wirkung vorhanden. Gartenerde, die reich an Mikroorganismen ist, baut schneller ab als ein Ackerboden. Neben der Zerstörung durch Mikroorganismen

kann auch eine Inaktivierung durch Adsorption oder chemische Veränderung in Frage kommen. Nach Wallhäusser (1951c) wird das Patulin oxydiert und damit inaktiviert, was im Widerspruch zu Jefferys' Ergebnissen steht. Die eigenen Versuche lassen eher eine beträchtliche Stabilität vermuten, hat doch das Patulin die Sterilisation ohne grosse Aktivitätseinbusse überstanden. Winter und Willeke (1951b) und Winter (1952) fanden für das Penicillin eine nennenswerte Adsorption an Bodenteilchen; viel wirksamer war aber die Tätigkeit der Mikroorganismen, die das Penicillin zerstörten.

Wir können also sagen, dass die Konkurrenz um das Strontium zwischen Mais und Pilz in grossem Masse von der antibiotischen Tätigkeit dieser Organismen abhängt. Aus den Arbeiten verschiedener Forscher geht hervor, dass solche Ausscheidungsprodukte in genügender Menge vorkommen und auch genügend stabil sind, um einen Einfluss auf die Entwicklung der Pflanzen ausüben zu können. Neben dieser Art der Einwirkung findet auch eine direkte Konkurrenz durch Aufnahme des Strontiums statt. Diese Art der Konkurrenz dürfte besonders bei niederer Konzentration des Ions eine Rolle spielen. Der Einfluss der indirekten Konkurrenz um andere Ionen, die die Aufnahme des Strontiums möglicherweise beeinflussen, ist nicht untersucht worden.

Zusammenfassung

1. *Zea Mays* und einige Bodenpilze (*Aspergillus ustus*, *Penicillium citrinum* und *Penicillium patulum*) wurden aseptisch in Einzel- und in Mischkulturen gezogen.

2. Es wurde der Einfluss dieser Pilze auf die Strontiumaufnahme von Mais untersucht.

3. Das Strontium wurde flammenspektrophotometrisch bestimmt.

4. Die Pilze umwuchsen die Maiswurzeln als Mantel; sie wuchsen jedoch nicht nur an der Wurzeloberfläche, sondern drangen auch in die äussersten Rindenpartien der Wurzel ein.

5. Die Wirkung der Pilze auf das Wachstum von Mais war unterschiedlich. Während *Aspergillus ustus* nicht stark hemmte, wirkte *Penicillium patulum* schon innert 7 Tagen in Mischkultur pathogen.

6. Die Strontiumaufnahme bei Mais wurde durch die Pilze gehemmt. Der Grad der Hemmung hing unter anderem ab von der Konzentration an Strontium, an Glukose, von der Dauer der Vorkultur und der Mischkultur.

Bei niederen Strontiumkonzentrationen war die Hemmung stärker als bei hohen.

Je länger der Mais vorkultiviert wurde, um so geringer war die Hemmung durch den Pilz.

Bei längerer Mischkultur nahm der Pilz überhand und richtete den Mais zugrunde.

Steigende Glukosegaben bewirkten ein stärkeres Wachstum des Pilzes und damit eine grössere Hemmung der Maispflanze.

7. Anhand von Mischkulturen von *Aspergillus ustus* mit Mais, wobei der Pilz *entfernt* von der Wurzel wuchs, so dass nur seine Stoffwechselprodukte zu den Mais-Wurzeln gelangen konnten, liess sich zeigen, dass die durch den Pilz hervorgerufene Hemmung der Strontiumaufnahme bei Mais auf seine Ausscheidungsprodukte zurückzuführen ist.

8. Die aus den Kulturlösungen der genannten Pilze isolierten reinen Antibiotika (Citrinin und Patulin) hatten denn auch eine starke Hemmung der Strontiumaufnahme (besonders bei niederen Konzentrationen an Strontium) zur Folge, die in ihrem Grad von der Konzentration des Antibiotikums abhing.

9. Da sowohl Mais wie Pilz Strontium aufnehmen, kann bei niederen Konzentrationen eine direkte Konkurrenz auftreten.

Die vorliegende Arbeit wurde im *Botanischen Institut der Universität Basel* unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber ausgeführt. Ich möchte ihm an dieser Stelle für sein Interesse an meiner Arbeit und die Überlassung der Mittel des Institutes herzlich danken.

Die *Kommission für Atomwissenschaft* hat die Arbeit durch Gewährung finanzieller Unterstützung wesentlich gefördert, wofür ihr auch hier bestens gedankt sei.

Ebenso bin ich den Laborantinnen Frau S. Bowald-Fischer, Fräulein E. Daniel, Fräulein S. Labhard, Fräulein I. Mähling und Fräulein M. Petersen für ihre wertvolle Mithilfe, besonders bei der Aufzucht der Pflanzen, zu grossem Dank verpflichtet.

Bürgin-Wolff A. 1959. Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **69**, 75–111 (Diss. Basel).

Burlet E. 1940. Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **50**, 519–544 (Diss. Basel).

Clark F. E. 1949. Soil microorganisms and plant roots. Adv. Agr. **1**, 241–288.

Fankhauser E. 1963. Über die Aufnahme von Strontium durch Bodenpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **73** (Diss. Basel).

Fisher R. A. 1946. Statistical Methods for Research Workers. 10th ed. London and Edinburgh.

Frank B. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **3**, 128–145.

— 1888. Über die physiologische Bedeutung der Mycorrhiza. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **6**, 248–269.

Frenzel B. 1960. Zur Ätiologie der Anreicherung von Aminosäuren und Amiden im Wurzelraum von *Helianthus annuus* L. Planta **55**, 169–207.

Gäumann E. und Jaag O. 1947. Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens II. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **57**, 132–147.

— — und Braun R. 1947. Antibiotika als pflanzliche Plasmagifte I. Experientia **3**, 70–71.

Gerretsen F. C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. Plant and Soil **1**, 51–81.

Harley J. L. 1959. The biology of mycorrhiza. Leonard Hill (Books) Ltd., London.

— und McCready C. C. 1952a. The uptake of phosphate by excised mycorrhizal roots of the beech. II. Distribution of phosphorus between host and fungus. New Phytol. **51**, 56–64.

— 1952b. The uptake of phosphate by excised mycorrhizal roots of the beech. III. The effect of the fungal sheath on the availability of phosphate to the core. New Phytol. **51**, 342–348.

Jahn E. 1934. Die peritrophe Mykorrhiza. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **52**, 463–474.

Jefferys E. G. 1952. The stability of antibiotics in soils. J. gen. Microbiol. **7**, 295–312.

Läuchli A. 1962. Über die Aufnahme von Strontium durch höhere Pflanzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **72**, 147–197 (Diss. Basel).

Melin E. und Nilsson H. 1955. Ca^{45} used as indicator of transport of cations to pine seedlings by means of mycorrhizal mycelium. Svensk Bot. Tidskrift **49**, 119–122.

— — und Hacskaylo E. 1958. Translocation of cations to seedlings of *Pinus virginiana* through mycorrhizal mycelium. Bot. Gaz. **119**, 243–246.

Morrison T. M. 1957. Mycorrhiza and phosphorus uptake. Nature **179**, 907–908.

Nelson N. 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. **218**, 375–380.

Pedretti E. 1958. Über Bestimmung und Verteilung autochthoner Spurenelemente in jungen Maispflanzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **68**, 103–144 (Diss. Basel).

Reed H. S. und Beck J. V. 1939. The effect of zinc on the growth process. Growth **3**, 1–7.

Reusser P. 1952. Über den Einfluss von Patulin auf den Gaswechsel der Hefezellen. Phytopath. Zeitschrift **19**, 221–265.

Robbins W. J. 1922. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. Bot. Gaz. **73**, 376–390.

Rudin P. E. 1956. Versuche zur Physiologie der Knöllchenbildung bei *Pisum sativum* L. Phytopath. Zeitschr. **26**, 57–80 (Diss. Basel).

Schaub H. 1958. Die Milchsäurebildung bei *Rhizopus chinensis* Saito. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **68**, 64–102 (Diss. Basel).

Seiler L. 1951. Über das Wurzelwachstum und eine Methode zur quantitativen Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **61**, 622–663 (Diss. Basel).

Stahl E. 1900. Der Sinn der Mykorrhizenbildung. Jahrb. wiss. Bot. **34**, 539–668.

Starkey R. L. 1929a. Some influences of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil: I. Historical and introductory. Soil Sci. **27**, 319–334.

— 1929b. II. Influence of the stage of plant growth upon abundance of organisms. Soil Sci. **27**, 355–378.

— 1929c. III. Influence of the stage of plant growth upon some activities of the organisms. Soil Sci. **27**, 433–444.

— 1931a. IV. Influence of proximity to roots on abundance and activity of microorganisms. Soil Sci. **32**, 367–392.

— 1931b. V. Effects of plants upon distribution of nitrates. Soil Sci. **32**, 395–404.

— 1938. VI. Microscopic examination of the rhizosphere. Soil Sci. **45**, 207–249.

Stille B. 1938. Untersuchungen über die Bedeutung der Rhizosphäre. Arch. Mikrobiol. **9**, 477–485.

Tolle R. und Rippel-Baldes A. 1958. Untersuchungen über die Rhizosphäre von Gramineen. Zbl. Bakt., II. Abt., **111**, 204–217.

Vöchting A. 1953. Über die Zinkaufnahme von *Zea Mays* L. und *Aspergillus niger* v. Tiegh. in Einzelkultur und in Mischkultur. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **63**, 103–161 (Diss. Basel).

Wagner B. 1928. Tabellen zum Eintauchrefraktometer. 2. Auflage, Sondershausen.

Wallhäusser K. H. 1951a. Die antibiotischen Beziehungen einer natürlichen Mikroflora. Arch. Mikrobiol. **16**, 201–236.

— 1951b. Untersuchungen über das antagonistische Verhalten von Mikroorganismen am natürlichen Standort. Arch. Mikrobiol. **16**, 237–251.

— 1951c. Inaktivierung von Patulin und Parascorbinsäure. Naturwissenschaften **38**, 190.

Winter A. G. 1950. Neue Gesichtspunkte in der Bodenmikrobiologie. Zbl. Bakt., I. Abt., **155**, 342*–351*.

— 1952. Untersuchungen über die Aufnahme von Penicillin und Streptomycin durch die Wurzeln von *Lepidium sativum* und ihre Beständigkeit in natürlichen Böden. Zeitschr. Bot. **40**, 153–172.

— 1953. Zum Problem der Mykorrhiza bei landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. I. Die Mykorrhizen der Gramineen. Z. Pfl.ernährung, Düngung, Bodenkunde **60**, 221–243.

— und Willeke L. 1951a. Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen und ihre Bedeutung für die Bodenmikrobiologie und Pflanzensoziologie. Naturwissenschaften **38**, 262–264.

— — 1951b. Über die Aufnahme von Antibioticis durch höhere Pflanzen und ihre Stabilität in natürlichen Böden. Naturwissenschaften **38**, 457–458.

Woods F. W. 1960. Biological antagonisms due to phytotoxic root exudates. Bot. Rev. **26**, 546–569.